

In vitro Nachweis von Strahlensensitivität
bei Ataxia teleangiectasia-Homozygoten und -Heterozygoten
mittels molekularer Zytogenetik

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae

(Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität
Jena

von Annett Johné

geboren am 10.04.1977 in Arnstadt

Gutachter 1: PD Dr. rer. nat. med. habil. T. Liehr, Jena

Gutachter 2: Prof. Dr. med. habil. T. Wendt, Jena

Gutachter 3: Frau PD Dr. I. Verdorfer, Innsbruck

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.04.2010

1	Einleitung.....	7
1.1	Entstehungsmechanismen von Strahlenschäden und Reparatur	8
1.1.1	Klinische Strahlenreaktion am Normalgewebe.....	8
1.1.1.1	Allgemeines	8
1.1.1.2	Akute Strahlenfolgen	9
1.1.1.3	Subakute Strahlenfolgen	9
1.1.1.4	Spätreaktion	9
1.1.1.5	Klassifikation von Strahlenschäden	10
1.1.2	Molekulare und zelluläre Mechanismen der Radiobiologie – Reparaturenzyme und -mechanismen.....	11
1.2	Individuelle Strahlensensitivität.....	13
1.3	Erhöhte Strahlensensitivität.....	15
1.3.1	Genetisch determinierte Erkrankungen mit erhöhter Strahlenempfindlichkeit	15
1.3.2	Ataxia teleangiectasia (AT) = Louis-Bar-Syndrom	15
1.4	Methoden zur Erfassung von Strahlenschäden	16
1.4.1	Colony survival assay (CSA).....	17
1.4.2	Micronucleus Assay	17
1.4.3	Comet assay (CA).....	18
1.4.4	Klassische (Konventionelle) Zytogenetik und Bänderungs- zytogenetik.....	19
1.4.5	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	19
1.4.5.1	3-Farb-FISH.....	20
1.4.5.2	Multicolor-FISH (M-FISH)	20
1.5	Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	22
2	Material	23
2.1	Untersuchungsmaterial	23
2.2	Reagenzien für die Kultivierung und Präparation von Lymphozyten..	24
2.3	Reagenzien für die Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH).....	24
2.4	Modifizierte Nukleotide und Antikörper	25
2.5	Puffer, Lösungen, Medien und Sonstiges.....	26

2.6	Geräte und Filter.....	27
3	Methoden	29
3.1	Verwendete Zellen und deren Bestrahlung.....	29
3.1.1	T-Lymphocyten für Kontrollen	29
3.1.2	Zelllinien von AT-Homozygoten und AT-Heterozygoten	29
3.2	Herstellung zygotenetischer Präparate für FISH.....	29
3.2.1	Zellkultur	29
3.2.1.1	Lymphozytenkultur - Kontrollen	29
3.2.1.2	Kultivierung der Zelllinien in Erlangen.....	30
3.2.2	Präparation von Chromosomen	30
3.2.2.1	Colcemidbehandlung.....	30
3.2.2.2	Präparation der Metaphasechromosomen	30
3.2.3	Auftropfen der Suspension auf Objektträger (OT).....	31
3.3	Multicolor FISH (M-FISH)	32
3.3.1	Vorbehandlung der Chromosomenpräparate	32
3.3.2	Vorbereitung der DNA-Sonden für die Hybridisierung.....	33
3.3.3	Denaturierung der auf dem OT fixierten Ziel-DNA	33
3.3.4	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	33
3.3.5	Posthybridisierungswaschungen, Sondendetektion und Gegen- färbung der Präparate	34
3.4	Aufnahme der Hybridisierungsergebnisse und Auswertung	35
3.4.1	Aberrationsanalyse	36
3.4.2	Ausgewertete Parameter	37
3.5	Bruchereignisse bei einzelnen Chromosomen	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Darstellung der unterschiedlichen erfassten Aberrationstypen	40
4.2	Mögliche Parameter zur Identifikation erhöhter Strahlensensitivität ..	42
4.2.1	Häufigkeit von Aberrationen.....	42
4.2.1.1	Unbestrahlte Proben (0Gy).....	42
4.2.1.2	Bestrahlung mit 0,7Gy	43
4.2.1.3	Bestrahlung mit 2,0Gy bzw. 1,4Gy	43

4.2.1.4	Aberrationshäufigkeit bei Zusammenfassung der Resultate in drei Gruppen	43
4.2.2	Durchschnittliche Bruchrate pro Mitose (B/M)	46
4.2.3	Prozentuale Verteilung der einzelnen Aberrationstypen	49
4.2.4	Maximale Anzahl von Bruchereignissen pro Metaphase	51
4.2.5	Charakterisierung der aufgetretenen CCR	52
4.3	Unterschiede in der Bruchrate pro Mitose (B/M) bei drei und 24 ausgewerteten Chromosomen	56
4.4	Beteiligung der einzelnen Chromosomen an Chromosomenbrüchen	61
4.5	Spezifische Translokationen	65
4.6	Persistierende Translokation	66
5	Diskussion	67
5.1	Mögliche Parameter zur Detektion <i>in vitro</i> strahlenbedingter Veränderungen	68
5.1.1	Anteil aberranter Zellen	68
5.1.2	Durchschnittliche Bruchrate pro Mitose (B/M)	69
5.1.3	Durchschnittliche Bruchrate (B/M) bei drei und 24 ausgewerteten Chromosomen	70
5.1.4	Durchschnittliche Zahl an CCR/M	71
5.1.5	Verteilung der einzelnen Aberrationstypen	73
5.2	Identifikation des AT-Homozygoten	74
5.3	Beteiligung einzelner Chromosomen an den Bruchereignissen	77
5.4	Vor- und Nachteile sowie Grenzen der M-FISH-Technik	79
5.5	Problematik prädiktiver Tests	80
5.6	Translokation t(7;14)	83
5.7	Stabile Translokation	84
5.8	Bedeutung komplexer Rearrangements	85
5.9	Fazit	85
6	Zusammenfassung	87

7	Literaturverzeichnis.....	88
8	Abkürzungsverzeichnis.....	108
9	Anhang	110
9.1	Danksagung.....	110
9.2	Ehrenwörtliche Erklärung.....	111
9.3	Lebenslauf	112

1 Einleitung

Maligne Tumoren stellen laut Statistik der WHO nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar. Neben der Chemotherapie zählt die Radiotherapie als zweitwichtigste Säule zu den Therapiestandards.

Wie die meisten Behandlungsmethoden, deren Ziel die Zerstörung von Tumorgewebe ist, führt auch die Bestrahlung zu unerwünschten Nebeneffekten am Normalgewebe. Diese manifestieren sich beispielsweise in Form von Fibrosen, Atrophien und Ulcerationen in Geweben und Organen. Die Normalgewebsreaktion limitiert die maximal applizierbare Strahlendosis.

Bei einem kleinen Teil der Patienten wurden im Anschluss an die Therapie ungewöhnlich starke Nebenwirkungen beobachtet, die im Einzelfall sogar den Tod des Patienten zur Folge hatten, z.B. untersucht durch Rogers et al., 2000. Diese sogenannten „over-reactors“ stellten laut einer Stanfordstudie an 4100 Tumorpatienten einen Anteil von 0.8%, klassifiziert anhand einer abnormal starken Hautreaktion nach Bestrahlung (Smith et al., 1980). Schwere Komplikationen nach Strahlentherapie wurden in neueren Studien bei 1-2% der Patienten diagnostiziert (Loeffler et al., 1990). Andere Autoren gehen von einer Rate von 5% der Radiotherapiepatienten mit Expression ernsthafter Komplikationen aus (Weissberg et al., 1998).

Die Möglichkeit der Bestimmung der individuellen Strahlensensitivität von Tumorpatienten vor Therapie wäre in der onkologischen Radiotherapie von großer Bedeutung. Bisher ist kein verlässlicher und schneller prädiktiver Test zur Bestimmung der individuellen Radiosensitivität verfügbar. Eine zuverlässige Voraussage einer herabgesetzten Toleranz gegenüber ionisierender Strahlung mittels eines solchen Tests könnte Patienten vor schweren schädigenden Therapie Nebenwirkungen bewahren beziehungsweise eine weitestgehende Ausschöpfung der therapeutischen Strahlenapplikation zur besseren lokalen Tumorkontrolle ermöglichen. Dies würde erlauben, Radiotherapieprotokolle individuell auf den Patienten abzustimmen und maximale Tumorkontrolle bei gleichzeitig akzeptablem Grad an lokalen Komplikationen an benachbarten Normalgeweben zu erzielen. Die jeweilige Therapieintensität könnte an die individuelle Therapietoleranz angepasst und somit der therapeutische Nutzen der Bestrahlung erhöht werden.

Es sind mehrere genetische Syndrome bekannt, die mit einer erhöhten Radiosensitivität einhergehen, beispielsweise die Ataxia teleangiectasia (AT; OMIM#208900). Individuen

mit einer genetisch determinierten Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit können als Positivkontrollen zur Erarbeitung von möglichen Parametern für einen prädiktiven Test aufgefasst werden. Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich auf die Untersuchung von Lymphozyten und lymphoblastoiden Zellen mittels Multicolor-FISH (M-FISH) nach unterschiedlich starker *in vitro* Bestrahlung. Es wurde untersucht, ob anhand der aufgetretenen Chromosomenaberrationen die individuelle Strahlensensitivität ermittelt werden kann. Modellhaft wurden Zellen gesunder Probanden denen des AT-Homozygoten bzw. der AT-Heterozygoten gegenübergestellt.

1.1 Entstehungsmechanismen von Strahlenschäden und deren Reparatur

1.1.1 Klinische Strahlenreaktion am Normalgewebe

1.1.1.1 Allgemeines

Die Auswirkungen von Strahlung auf menschliches Normalgewebe werden in der Klinik in akute, subakute und späte Bestrahlungsfolgen unterteilt (Withers and McBride, 1997). Diese Bezeichnungen beziehen sich auf eine zeitliche Abfolge von Veränderungen, sagen jedoch über die Pathogenese der Gewebsreaktionen nichts aus. Jedes Gewebe kann sowohl akute als auch späte Symptome infolge von Bestrahlungsschäden entwickeln (Withers and McBride, 1997). Die unspezifischen späten Veränderungen resultieren hauptsächlich aus dem Verlust der Regenerationskapazität und führen unter anderem zur Ausprägung von Ulcerationen, Fistelbildung oder zur Fibrose und Atrophie des Gewebes (Peters et al., 1988; Whithers et al., 1995; Begg and van der Kogel, 2008). Die genauen Ursachen für die unterschiedlichen Reaktionsgrade von Geweben nach Bestrahlung sind noch immer unklar.

Grösstenteils sind Normalgewebsschäden auf den Verlust der zellulären Teilungsfähigkeit zurückzuführen, die durch mitotischen Zelltod, Apoptose oder terminale Differenzierung bedingt sein kann (Dahm-Daphi et al., 1998).

Verschiedene Studien untersuchten den Einfluss von exogenen und endogenen Co-Faktoren auf die Expression von Strahlenschäden am Normalgewebe (Bentzen and Overgaard, 1994; Turesson et al., 1996).

1.1.1.2 Akute Strahlenfolgen

Akute Reaktionen auf ionisierende Strahlen sind in Geweben mit hoher Proliferationsrate besonders ausgeprägt. Dazu zählen die Mucosa des Oropharynx, des Ösophagus sowie des übrigen Gastrointestinaltraktes, das Knochenmark und die Haut (Michalowski et al., 1981; Michalowski et al., 1995).

Unter der Voraussetzung, dass die Stammzellen des proliferierenden Gewebes nicht über einen kritischen Wert hinaus geschädigt werden, sind diese akuten Veränderungen in Form von Mukositis und Erythembildung vorübergehender Natur. Prinzipiell ist eine vollständige Erholung und Wiederherstellung möglich.

1.1.1.3 Subakute Strahlenfolgen

In diese Kategorie gehören beispielsweise die Strahlenpneumonitis 2-3 Monate nach Radiatio der Lunge (Chopra and Bogart, 2009) und das Lhermitte-Syndrom nach Rückenmarksbestrahlung. Im Anschluß an eine craniale Radiotherapie kann sich bei den Patienten eine Somnolenz infolge eines strahleninduzierten Hirnödems entwickeln (Hopewell and van der Kogel, 1999; Coderre et al., 2006).

1.1.1.4 Spätreaktion

Die unerwünschten Späteffekte der Radiotherapie können generell als Folge von Zellverlusten in langsam proliferierenden Geweben angesehen werden. Sie bilden sich aus, wenn trotz komplexer zellulärer Interaktionen die Integrität eines Gewebes nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Die Zahl der gewebespezifischen Parenchymzellen nimmt immer mehr ab, während parallel dazu eine Vermehrung des Bindegewebes angeregt wird. Die unmittelbare Folge dieser Umbauvorgänge ist eine Fibrosierung der jeweiligen Organe und sekundär die Entstehung von Stenosen, beispielsweise im Respirations- und Gastrointestinaltrakt. Insbesondere die strahleninduzierte Schädigung der Endothelzellen der Blutgefäße lässt die Gefässarchitektur zusammenbrechen und führt zunehmend zu Komplikationen (Hopewell and Withers, 1998). Die mangelhafte Blutversorgung des Gewebes spiegelt sich insbesondere im Auftreten von Nekroseherden und Ulcerationen wider (Withers et al., 1995). Aufgrund ihres progressiven und irreparablen

Charakters stellen die Spätfolgen die problematischere Form in der klinischen Praxis dar.

Das Komplikationsrisiko nach Radiatio variiert von Gewebe zu Gewebe und wird neben der individuellen Strahlensensitivität durch verschiedenste Faktoren wie chirurgische Eingriffe, Chemotherapie oder Infektionen zusätzlich erhöht.

1.1.1.5 Klassifikation von Strahlenschäden

Um die Strahlenreaktion am Normalgewebe bei Radiotherapiepatienten in der Klinik zu erfassen, wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen Kriterien zur Einteilung aufgetretener Schäden erarbeitet. Durchgesetzt haben sich die Skala der RTOG/EORTC (Cox et al., 1995) und die LENT SOMA scale mit Schädigungen von Grad 1 bis 4 (Rubin et al., 1995; LENT SOMA scales, 1995).

Grad 1 repräsentieren gering ausgeprägte Symptome, die keine Behandlung erfordern. Grad 2 stellen moderate Symptome dar, die gut mittels konservativer Therapie angegangen werden können (Pavy et al., 1995). Bei Schäden vom Grad 3 handelt es sich um ernsthafte Beeinträchtigungen, die sich negativ auf die Bewältigung der täglichen Aktivitäten des Patienten auswirken und aggressivere Therapien notwendig machen. Strahlenschäden vom Grad 4 umfassen irreversible Funktionsverluste, die lediglich durch massive Ausschöpfung therapeutischer Interventionen beherrschbar sind.

Die Skalierung der Schädigung wurde für alle Organsysteme bzw. Gewebearten erstellt, so z.B. für das Zentralnervensystem, Kopf- und Halsorgane, Blutgefäße, Gastrointestinaltrakt, Urogenitaltrakt, Haut, Muskelgewebe etc.

Zur Veranschaulichung der klinischen Gradeinteilung ist im folgenden eine Tabelle am Beispiel der Haut und des Subkutangewebes modifiziert nach LENT SOMA scales (1995) dargestellt.

Tabelle 1: Einteilung von Strahlenschäden in 4 Schweregrade bezüglich verschiedener Parameter nach LENT/SOMA scales, 1995

	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4
Empfindung	Hypersensitivität, Juckreiz	intermittierende Schmerzen	persistierende Schmerzen	schwächende Dysfunktion
Ödeme	asymptomatisch	symptomatisch	sekundäre Dysfunktion	totale Dysfunktion
Alopezie	Haarausdünnung	fleckig, permanent	kompletter permanenter Haarverlust	
Pigmentierung	transitorische leichte Veränderungen	permanente umschriebene Veränderungen		
Ausdehnung von Ulcerationen und Nekrosen	epidermal	dermal	subkutan	bis zur Knochenexposition
Teleangiektasien	gering	< 50%	> 50%	
Folgen der Fibrosierung	asymptomatisch	symptomatisch	sekundäre Dysfunktion	totale Dysfunktion
Atrophie und Kontraktion	asymptomatisch	symptomatisch, < 10% betroffen	sekundäre Dysfunktion, 10-30% betroffen	totale Dysfunktion, > 30% betroffen

Tabelle 2: Einteilung von Strahlenschäden in 4 Schweregrade modifiziert nach U. Hoeller, 2003

RTOG/EORTC	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4
Haut	leichte Atrophie und Pigmentveränderungen, geringer Haarverlust	fleckige Atrophie, moderate Teleangiektasien, totaler Haarverlust	umschriebene Atrophie, ausgedehnte Teleangiektasien	Ulceration
Subcutangewebe	leichte Induration (Fibrose) und Verlust von subkutanem Fettgewebe	moderate asymptomatische Fibrose, leichte Kontraktionen, linear reduction < 10%	starke Induration und Verlust von subkutanem Fettgewebe, field contracture, linear reduction > 10 %	Nekrosen

1.1.2 Molekulare und zelluläre Mechanismen der Radiobiologie – Reparaturenzyme und -mechanismen

Die zelluläre DNA ist ein ständiges Ziel reaktiver Moleküle, die aus dem zelleigenen Stoffwechsel und aus der Umwelt stammen. Die toxischen und mutagenen Folgen dieser Angriffe werden durch Reparaturmechanismen minimiert. Nach derzeitigem Stand wissenschaftlicher Erkenntnisse wird die Schädigung der DNA der Zellen als primärer

Mechanismus der zytotoxischen Wirkung ionisierender Strahlen angesehen (Stone et al., 2003; Turesson et al., 2003). Nichtreparable oder falsch reparierte Doppelstrangbrüche (DSB) werden dabei als bedeutendste Form der DNA-Schädigung deklariert (Dahm-Daphi et al., 1998; Khanna et al., 2001, Turesson et al., 2003). Aber auch Veränderungen an den Mikrotubuli und Membransystemen der Zelle sowie Modifikationen in Signaltransduktionswegen bedingen die Ausprägung von Schäden nach Bestrahlung (Bourne et al., 1983; Somosy, 2000). Neben direkten Schädigungsmechanismen wurden zahlreiche ungezielte Wirkungen, sogenannte „bystander effects“, beschrieben, die zur Ausbildung von strahleninduzierten Zellschäden beitragen (Morgan, 2003; Coates et al., 2004). Nach der Einwirkung ionisierender Strahlen reagiert die Zelle mit Veränderungen in der Regulation des Zellzyklus und setzt DNA-Reparaturmechanismen in Gang. Die DNA-Reparatur ist ein essentielles molekulares Verteidigungssystem gegen Agenzien, die Malignome oder degenerative Erkrankungen auslösen oder das Altern von Zellen bedingen. Scheitern diese Gegensteuerungsversuche der geschädigten Zelle, kommt es zum genetisch programmierten Zelltod durch Apoptose, Nekrose oder zur malignen Entartung der Zelle infolge Verlustes genetischer Information oder fehlgeschlagener DNA-Reparatur.

DSB in Chromosomen können endogen während der Replikation und Meiose entstehen oder durch exogene Einflüsse, wie beispielsweise ionisierende Strahlen, induziert werden.

Zu den wesentlichen Reparaturmechanismen bei Säugetieren zählen Nukleotidexcisionsreparatur (NER), Basenexcisionsreparatur (BER), homologe Rekombination und nonhomologous end joining (Lindahl and Wood, 1999). Mittels Nukleotidexcisionsreparatur reagieren Zellen hauptsächlich auf exogen bedingte DNA-Schäden, während die Basenexcisionsreparatur insbesondere zur Korrektur von Schäden endogenen Ursprungs herangezogen wird (Hoeijmakers, 2001). Als zwei Hauptwege der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in Säugetierzellen sind die homologe Rekombination und nonhomologous end joining identifiziert worden (Rothkamm et al., 2001, Khanna and Jackson, 2001, Frankenberg-Schwager et al., 2008). Desweiteren kann die DNA-Integrität durch mismatch repair und Telomermetabolismus gesichert bzw. wiederhergestellt werden (Hoeijmakers, 2001). Ein weiterer Reparaturmechanismus kann durch den auf DNA-Replikation basierenden FoSTeS (Fork Stalling and Template Switching)-Mechanismus erklärt werden (Lee et al., 2007; Gu et al., 2008). Zahlreiche Reparaturenzyme überwachen die Intaktheit der DNA und leiten gegebenenfalls die Korrektur

entstandener Schäden ein (Bentzen, 2006, Branzel and Foliani, 2008). Inzwischen kennt man mehr als 130 Gene, die an der DNA-Reparatur, Zellzyklusüberwachung und Kontrolle der Apoptose beteiligt sind (Wood et al., 2001). Dazu zählen Transkriptionsfaktoren wie p53, ATM, NBS1 oder Gene wie LIG3 und XRCC1, die ATP-abhängige Ligasen kodieren. Entscheidend für die homologe Rekombination sind z.B. BRCA1, BRCA2, Rad51 und viele mehr. Für die NER werden u.a. Produkte der Gene Rad7 und Rad16 benötigt, eine detaillierte Übersicht bietet eine Arbeit von Wood et al., (2001). Als bedeutend für die Reparatur von DSB wurden ebenfalls die Gene XRCC1-8 (=X-ray-sensitive cross complementation) identifiziert (Thompson and Jeggo, 1995).

Das *ATM*-Gen besteht aus 66 Exons. Das Produkt des *ATM*-Gens ist ein etwa 370 kDa grosses Protein, das zur Familie der Phosphatidylinositol-3-Kinasen gehört. Es spielt eine zentrale Rolle bei der Erkennung und Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden und in der Zellzykluskontrolle. Prinzipiell können Zellen auf Schädigungen der genetischen Information mit einer Verlangsamung der Progression des Zellzyklus reagieren, um Zeit für die Reparatur von DNA-Schäden zu gewinnen und eine Weitergabe veränderter DNA zu verhindern. Das *ATM*-Gen kodiert eine Proteinkinase, deren Aktivität direkt oder indirekt durch DNA-Schäden stimuliert wird und die mit einer Kaskade von Effektormolekülen wie z.B. p53, BRCA1, c-Abl und NBS1 sowie anderen verknüpft ist (Khanna and Jackson, 2001). ATM reguliert den G₁/S-Kontrollpunkt im Zellzyklus nach Exposition gegenüber ionisierender Strahlung teilweise durch Kontrolle der Aktivierung und Stabilisierung des Produkts des Tumorsuppressorgenes p53, das als Transkriptionsfaktor fungiert und die Auslösung der Apoptose nach strahleninduzierter DNA-Schädigung steuert (Gupta et al., 1996).

1.2 Individuelle Strahlensensitivität

Epidemiologische Studien stützen die These, dass die Radiosensitivität genetisch determiniert und interindividuell verschieden ist. Personen unterscheiden sich stark voneinander in der Empfindlichkeit ihrer Körpergewebe gegenüber den schädigenden Effekten ionisierender Strahlung (Norman et al., 1992; Tucker et al., 1992). Bentzen et al. (1994) klassifizierten bezüglich der Einflussfaktoren drei Hauptkategorien. Erstens beschrieben sie exogene patientenspezifische Faktoren wie z.B. Alter, Hämoglobingehalt

des Blutes, Nikotinabusus usw., zweitens Co-Morbiditäten in Form von primären Malignomen, Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie, Kollagenosen, Vaskulitiden, Infektionen und Immunsuppression. Drittens wurde der intrinsischen zellulären Radiosensitivität, die interindividuell variiert, entscheidende Bedeutung bei der Ausprägung von Normalgewebsreaktionen nach Bestrahlung beigemessen (Bentzen et al., 1994). Die beobachtete Variation von Reaktionen nach Strahlentherapie führten auch Burnet et al. (1996) hauptsächlich auf Unterschiede in der individuellen Strahlensensitivität der Normalgewebe zurück.

Ähnliche Schlussfolgerungen gehen aus einer Studie von Turesson et al. hervor, die prognostische Faktoren für die Unterschiede in der Strahlenreaktion an 402 Brustkrebspatientinnen mit identischen Radiotherapieprotokollen anhand des Auftretens von akuten und späten Hautreaktionen untersuchten (Turesson et al., 1996). Auch in dieser Arbeit wurden 20 patienten- und behandlungsbezogene Faktoren wie Alter, Rauchgewohnheiten, Blutdruck, Diabetes mellitus, Hormontherapie, Chemotherapie, individuelle Dosis und total effect etc. berücksichtigt. Dabei wurde postuliert, dass diese exogenen Faktoren nur etwa 30% der Unterschiede in der Ausprägung der Strahlenreaktion zwischen den einzelnen Patientinnen erklären. Die übrige Variabilität wurde auf die interindividuellen Unterschiede in der zellulären Radiosensitivität aufgrund genetischer und unbekannter epigenetischer Faktoren zurückgeführt (Turesson et al., 1996). Einen Überblick über prognostische Faktoren, die zur Ausprägung von Spätschäden nach Radiotherapie prädisponieren, bietet eine Studie von Lilla et al. (2007), in der Brustkrebspatientinnen nach brusterhaltender Therapie mit anschließender Bestrahlung untersucht wurden.

Das gegenwärtige Wissen über diese Problematik ist noch immer fragmentär. Die interindividuelle Heterogenität in der Strahlensensitivität in der Gesamtbevölkerung wird gegenwärtig insbesondere auf Polymorphismen und Mutationen mit niedriger Penetranz zurückgeführt (Renwick et al., 2006, Distel et al., 2006). Viele Erkenntnisse auf dem Gebiet der Radiosensitivität gehen auf die Untersuchung von Patienten mit seltenen Erbkrankheiten, die mit einer erhöhten Strahlensensitivität einhergehen, zurück. Trotzdem ist deutlich geworden, dass die Variation in der individuellen Strahlenempfindlichkeit ein wichtiges Problem in der Radiotherapie darstellt. Eine große Zahl von Krebspatienten erhält eine Radiotherapie und einige reagieren so hypersensitiv auf die Bestrahlung, daß die Behandlung modifiziert oder vorzeitig abgebrochen werden muß (Peters,

1996). Untersuchungen legen nahe, daß diese hypersensitiven Patienten bis zu 3% der Gesamtbevölkerung repräsentieren (Streffler, 1997; Weissberg et al., 1998).

1.3 Erhöhte Strahlensensitivität

1.3.1 Genetisch determinierte Erkrankungen mit erhöhter Strahlenempfindlichkeit

Die Unversehrtheit der DNA eines Organismus wird in der Natur durch verschiedene Reparaturmechanismen aufrechterhalten. Genetische Defekte können ein fehlerhaftes Arbeiten dieser Schutzmechanismen bedingen und so die Sequenz der DNA in einer Zelle verändern. Zellen, die eine erhöhte Frequenz spontaner chromosomaler Aberrationen aufweisen, bezeichnet man als „genomisch instabil“.

Die AT zählt zusammen mit dem Nijmegen Breakage Syndrom (NBS), dem Bloom-Syndrom und der Fanconi-Anämie zur Gruppe der klassischen Syndrome mit Chromosomeninstabilität.

1.3.2 Ataxia teleangiectasia (AT) = Louis-Bar-Syndrom

Die AT (OMIM#208900) zeichnet sich durch ein sehr pleomorphes Erscheinungsbild aus und unterliegt einem autosomal-rezessiven Vererbungsmodus. Die Inzidenz ist regional verschieden und schwankt zwischen 1:40.000 und 1:300.000 in den USA (www.geneclinics.com). Die Prävalenz von heterozygoten ATM-Mutationen in westlichen Bevölkerungen wird derzeit auf 0,5-1% geschätzt (Renwick et al., 2006)

Das bei Patienten mit AT mutierte Gen wurde auf Chromosom 11q22-23 lokalisiert und später durch positionelle Klonierung identifiziert (Gatti et al., 1988; Savitsky et al., 1995a).

Bei AT-Homozygoten beginnt die neurologische Manifestation der Multisystemerkrankung in der frühen Kindheit mit Ausprägung einer progressiven cerebellären Ataxie, Augenmotilitätsstörungen und einer undeutlichen verwaschenen Sprache im Sinne einer Dysarthrie. Okuläre Teleangiectasien können fast ausnahmslos bei den Patienten beobachtet werden (Woods and Taylor, 1992).

Ganz wesentlich ist die erhöhte Sensitivität der Betroffenen gegenüber ionisierender Strahlung, die auch bei AT-Heterozygoten nachgewiesen worden ist. Die Prädisposition zur Entwicklung von Malignomen charakterisiert die AT-Patienten (Gatti et al., 1991).

Die meisten malignen Erkrankungen treten bereits im Kindesalter auf, wobei B-Zell-Lymphome und Leukämien vom T-CLL-Typ dominieren. Immundefekte, wie z.B. das Fehlen bestimmter Immunglobulinklassen, entwickeln sich bei mehr als der Hälfte der homozygoten ATM-Mutationsträger. Dabei finden sich die Immundefekte sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene und äußern sich in erster Linie in Form von rezidivierenden sinopulmonalen Infekten, die neben malignen Erkrankungen die häufigste Todesursache bei Ataxia teleangiectasia im Kindes- und Jugendalter darstellen (Hecht et al., 1966; Woods and Taylor, 1992; Nowak-Wegrzyn et al., 2004).

Als typisch für die AT wurde in der Literatur mehrfach das spontane Auftreten der Translokation t(7;14) beschrieben (Hecht et al., 1975; Taylor et al., 1981).

Studien haben Anhaltspunkte für ein erhöhtes Brustkrebsrisiko unter Trägern von ATM-Mutationen ergeben (Swift et al., 1991; Athma et al., 1996; Broeks et al., 2000). Auch AT-Heterozygote besitzen ein erhöhtes Malignomrisiko (Stumm et al., 2001). Weitere Arbeiten bestätigten eine größere Brustkrebs-Inzidenz bei AT-heterozygoten Frauen (Swift et al., 1987; Morrell et al., 1990; Inskip et al., 1999). Andere Untersuchungen hingegen verneinen einen Zusammenhang zwischen AT-Heterozygotie und der Entwicklung von early onset Mammacarcinomen (FitzGerald et al., 1997).

Dem ATM-Protein kommt im Zellzyklus eine Schlüsselfunktion bei der Erkennung und Reparatur von Chromosomenschäden zu (Meyn, 1999). Ihm wird im Zellkern eine Rolle als „caretaker“ beigemessen, dessen Funktionsstörung zur Entstehung von Tumoren prädisponiert und die gesteigerte Radiosensitivität von AT-Patienten mitverursacht. Aufgrund der erhöhten Tumorprädisposition muss davon ausgegangen werden, dass AT-Mutationsträger, die zugleich vermehrt strahlensensible Patienten darstellen, mit höherer Wahrscheinlichkeit einer Radiotherapie zugeführt als genetisch unauffällige Individuen (Scott et al., 1996; Scott et al., 1998). Auch AT-Heterozygote sollten die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung möglichst meiden. Insbesondere die Erkennung von AT-Heterozygoten in der Klinik ist schwierig, da diese im Gegensatz zu homozygoten AT-Mutationsträgern klinisch unauffällig sind. Zur Überwindung dieser Problematik könnte ein labordiagnostischer Test dienen, der zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Studie noch nicht verfügbar war.

1.4 Methoden zur Erfassung von Strahlenschäden

Das genetische Material lebender Organismen kann durch ionisierende Strahlung in einer Vielzahl von Möglichkeiten verändert werden, von kleinsten Modifikationen im DNA-Molekül bis hin zum Verlust ganzer Chromosomen.

Chromosomenschäden sind empfindliche Indikatoren für eine vorangegangene Exposition gegenüber ionisierenden Strahlen (Dahm-Daphi et al., 1998; Khanna and Jackson, 2001). Verschiedene Verfahren wurden in der Genetik entwickelt und angewandt, um Strahlenfolgen zu beurteilen. Im Folgenden sollen die bisherigen Versuche der Erfassung von Strahlenschäden mit ihren Vor- und Nachteilen kurz erläutert werden.

1.4.1 Colony survival assay (CSA)

Mittels CSA kann die Sensitivität von Zellen nach Radiatio anhand ihrer erhaltenen oder eingeschränkten Fähigkeit zur Zellteilung erfasst werden.

Nach Vorbehandlung mit EDTA und Trypsin werden die Zellen bestrahlt und auf einem Nährmedium unter Kulturbedingungen für 10 Tage inkubiert. Danach werden sie mit Ethanol 99,9% fixiert und mit 0,1-%iger Giemsalösung angefärbt. Zur Auswertung zählt man alle Kolonien, die eine Mindestanzahl von Zellen aufweisen. Eine bestimmte Anzahl von Zellteilungen ist demzufolge für einen CSA erforderlich. Neben dem hohen Zeitaufwand existieren noch weitere Probleme bei der Auswertung, z.B. Artefakte infolge Zellverklumpung (Shibamoto et al., 1991). Beim CSA handelt es sich um einen unspezifischen Test.

1.4.2 Micronucleus Assay

Während der Zellteilung repliziert sich das gesamte genetische Material einer Zelle und wird gleichmäßig auf die beiden neu entstandenen Tochterzellen verteilt. Wenn an Chromosomen oder Spindelapparat durch Chemikalien bzw. Strahlen Schäden verursacht werden, kann eine Störung dieser Aufteilung entstehen. Bruchstücke oder ganze Chromosomen können dann in keinen der beiden Tochterzellkerne integriert werden und formieren sich zu einem zusätzlichen „micronucleus“. Micronuclei sind chromatin-beinhaltende Strukturen im Cytoplasma, die von einer Membran umgeben sind, keine nachweisbare Verbindung zum Zellkern aufweisen und durch Ausschluß ganzer Chromosomen oder Chromosomenfragmente bei der Zellteilung entstehen. Micronuclei kön-

nen mit einer speziellen Methode nach Anfärbung der DNA mikroskopisch erfasst werden (Fenech, 1993). Die Bildung mehrerer Micronuclei in einer Zelle ist möglich. Der Micronucleus Assay liefert Informationen, inwieweit bestimmte Chemikalien oder Strahlen die Chromosomenstruktur und somit Funktion beeinträchtigen und kann zur Prüfung der carcinogenen Wirkung von Agenzien genutzt werden. Der Micronucleus Assay ist einfacher und schneller durchzuführen als die Analyse chromosomaler Aberrationen und hat ein größeres Potential für die Automatisierung (Joksic et al., 2001). Trotz breiter Anwendung der Methode existieren umfangreiche Unterschiede in Methodik und statistischer Auswertung je nach Labor, wodurch selten reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden konnten und dem Micronucleus assay deshalb ein noch nicht ausgereiftes Stadium bescheinigt wurde (Surralles et al., 1997). Ein weiterer Nachteil ist, daß Micronuclei nur entstehen, wenn Zellen sich teilen und die Lymphocyten einzelner Individuen sehr unterschiedlich auf PHA reagieren, wodurch der Anteil sich teilender Zellen von Kultur zu Kultur stark variiert (Fenech and Morley, 1984). Große interindividuelle Unterschiede in der spontanen Bildung von Micronuclei schränken die zuverlässige Auswertung der Methode weiter ein (Vral et al., 1997).

1.4.3 Comet assay (CA)

Auch mittels DNA-Gelelektrophorese können DNA-Schäden untersucht werden. Man unterscheidet die Pulsfeld-Gelelektrophorese, die Konstantfeld-Gelelektrophorese und die Einzelzell-Mikrogelelektrophorese, die auch als Comet assay (CA) bezeichnet wird. Die Einzelzell-Mikrogelelektrophorese bietet eine schnelle und sensitive Methode, um bei einzelnen Zellen die verschiedenen Stufen der DNA-Schädigung sichtbar zu machen. Zellen werden auf ein Agarosegel aufgebracht, lysiert und mit mehreren Substanzen behandelt, die zur Entfernung von Membranstrukturen und Proteinen eingesetzt werden (Singh et al., 1988). Nach Zusatz einer Pufferlösung, die eine Entspiralisierung und alkalische Schädigung der DNA bewirkt, erfolgt die elektrophoretische Auftrennung. Nach Anlegen eines schwachen elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente zur Anode. Der Umfang der Wanderung und die zurückgelegte Strecke spiegeln den Zusammenhang mit der Fragmentgröße wider.

Zur Sichtbarmachung der DNA verwendet man Fluoreszenzfarbstoffe, die unter dem Mikroskop ein Bild erzeugen, das an den Kopf und Schweif eines Kometen erinnert und so der Methode den Namen gab. Der Comet assay ermöglicht die Detektion von Einzel-

und Doppelstrangbrüchen und wird vielfach in der genetischen Toxikologie und Onkologie zur Untersuchung von DNA-Schäden eingesetzt (Olive, 1999). Das Verfahren ist allerdings sehr empfindlich gegenüber exogenen Einflüssen.

1.4.4 Klassische (Konventionelle) Zytogenetik und Bänderungszytogenetik

Das klassische Bänderungsverfahren ist zeitaufwändig und erfordert zur Auswertung Personal mit langjähriger Erfahrung. Auch kann anhand der hellen und dunklen Banden nur ein begrenztes Spektrum an Aberrationen zuverlässig erkannt werden (Bender et al., 1988). Es wurden bereits verschiedene Versuche unternommen, verstärkt strahlensensible Personen unter Anwendung von konventioneller Giemsa-Färbung oder GTG-Bänderung zu identifizieren (Shiloh et al., 1989; Scott et al., 1996; Tchirkov et al., 1997). Meist wurde lediglich die Giemsa-Färbung ohne Bänderung angewendet, wodurch zwar Fragmente und dicentrische Chromosomen erkannt wurden, jedoch keine Zuordnung zu einzelnen Chromosomen möglich war. Mittels klassischer Zytogenetik konnten nicht alle Heterozygoten mit erhöhter Strahlenempfindlichkeit im Rahmen einer Studie mit Brustkrebspatientinnen bestimmt werden (Jones et al., 1995). Vor allem die Aufdeckung reziproker Translokationen und CCR führte unter Verwendung konventioneller Zytogenetik nicht zu zufriedenstellenden Resultaten (Johnson et al., 1998; Neubauer et al., 1997).

1.4.5 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Als wesentliches Verfahren der molekularen Zytogenetik erlaubt die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) beispielsweise das Anfärben von Chromosomen nach Hybridisierung fluoreszenzmarkierter DNA-Banken. Werden dabei ganze Chromosomen mit Hilfe chromosomenspezifischer DNA-Banken erfasst, bezeichnet man dies als whole chromosome painting (wcp). Die FISH kann zur Untersuchung komplizierter Umbauten in Tumorzellen und Bestimmung der Zusammensetzung von sogenannten Markerchromosomen eingesetzt werden (Senger et al., 1998).

Die „painting“-Sonden werden z.B. durch Mikrosezierung oder chromosome flow sorting erzeugt, wobei die DNA mittels PCR unter Verwendung eines degenerierten Oligonukleotid-Primers (DOP-PCR) *in vitro* amplifiziert wird (Senger et al., 1998). In einer zweiten PCR werden die Sonden mit Fluorochrom-gekoppelten Nukleotiden markiert und

können, nachdem sie durch Erhitzen denaturiert wurden, auf ebenfalls zuvor denaturierte und fixierte Metaphaseplatten aufgebracht werden. Die Hybridisierung erfolgt über komplementäre Basenpaarung.

1.4.5.1 3-Farb-FISH

Bei der 3-Farb-FISH werden drei wcp-Sonden simultan eingesetzt. Die Technik deckt nicht den totalen DNA-Gehalt einer Zelle ab. Nur ein Teil des Genoms kann dargestellt und analysiert werden, abhängig vom Chromatingehalt der ausgewählten fluoreszenzgefärbten Chromosomen (Cigarran et al., 1998). Bei Anfärbung der Chromosomen eins, zwei und vier werden z.B. 22% des DNA-Gehaltes menschlicher Chromosomen abgedeckt (Dunst et al., 1998). Gebhart et al. (1996) nutzten die 3-Farb-FISH im Vergleich zur klassischen Zytogenetik zur Untersuchung von peripheren Blutlymphocyten von 27 Tumorpatienten nach Strahlentherapie und stellten fest, dass zur Erkennung strahleninduzierter Chromosomenschäden die FISH die aussagefähigere Methode darstellt. Eine Detektion der meisten Arten chromosomaler Veränderungen ist möglich (Natarajan et al., 1992), weshalb FISH verglichen mit Giemsa-Banding die überlegene Methode darstellt (Plummer et al., 1994). S. Neubauer und P. Finnon konnten diese Form der *in situ* Hybridisierung ebenfalls erfolgreich zur Erkennung radiosensitiver Krebspatienten einsetzen (Neubauer et al., 1996; Finnon et al., 1999). Allerdings wurden drei zufällig ausgewählte Chromosomen angefärbt, obwohl eine zufällige Verteilung der Aberrationen unter allen Chromosomen noch kontrovers diskutiert wird (Cigarran et al., 1998).

1.4.5.2 Multicolor-FISH (M-FISH)

Bei der M-FISH-Methode werden alle 46 Chromosomen eines Chromosomensatzes simultan mittels wcp-Sonden mit spezifischen Fluorochromen markiert (Speicher et al., 1996; Schröck et al., 1996; Senger et al., 1998).

Durch Kombination von mindestens fünf verschiedenen Fluorochromen kann dabei jedes einzelne der 24 menschlichen Chromosomen in einer unterschiedlichen Farbe simultan dargestellt werden (Senger et al., 1998), wodurch sich numerische Chromosomenaberrationen und strukturelle Veränderungen wie Translokationen, Deletionen und komplexe chromosomale Umbauten identifizieren lassen. M-FISH liefert zum Zeitpunkt der Studie den umfassendsten Informationsgehalt über Metaphasechromosomen im

Hinblick auf chromosomale Veränderungen, da der gesamte DNA-Gehalt des Genoms mit nur einem Hybridisierungsexperiment beurteilbar ist und selbst komplexe Rearrangements auf ihre Zusammensetzung hin untersucht werden können.

Die M-FISH-Methode wurde zur Gewinnung eines vollständigeren Bildes vom Umfang strahleninduzierter Aberrationen bereits erfolgreich erprobt (Kuechler et al., 2002) und aufgrund der aufgezählten Vorteile in der vorliegenden Arbeit angewandt.

1.5 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Ein wesentliches Problem in der Radiotherapie besteht in der Erkennung besonders strahlensensibler Individuen vor Beginn der Behandlung. Verschiedene cytogenetische und molekularcytogenetische Methoden sind zur Erforschung dieser Problematik bereits erprobt worden. Bisher ist jedoch kein zuverlässiger Test für die prädiktive Ermittlung der individuellen Strahlensensitivität verfügbar.

Eine prinzipiell in Frage kommende Technik ist die M-FISH-Methode, die in der vorliegenden Arbeit zur Ermittlung von Basisdaten und eingesetzt und auf ihre Anwendbarkeit getestet wurde. Die umfassende Charakterisierung des gesamten Genoms auf molekularzytogenetischer Ebene nach *in vitro* Bestrahlung lymphocytärer Zellen mittels M-FISH soll Rückschlüsse auf die individuelle Strahlensensitivität der Testpersonen ermöglichen. AT-Genträger, die bekannte Überreagierer darstellen, fungieren dabei als Positivkontrolle für erhöhte Strahlenempfindlichkeit.

Die Etablierung eines prädiktiven Tests, der eine prätherapeutische Erkennung von Patienten mit extrem veränderter Strahlenempfindlichkeit zulässt, stellt das Fernziel dieser Untersuchungen dar.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Erlaubt die M-FISH-Technik eine zuverlässige Detektion einer erhöhten Strahlensensitivität nach *in vitro* Bestrahlung von Lymphocyten und lymphoblastoiden Zellen?
2. Können durch diese Technik Kontrollen von AT-Heterozygoten und diese von einem homozygoten AT-Mutationsträger unterschieden werden?
3. Sind einzelne Typen von Chromosomenaberrationen charakteristisch für eine erhöhte Radiosensitivität und können sie zu deren Bestimmung genutzt werden?
4. Gibt es Hinweise darauf, dass einzelne Chromosomen häufiger in Bruchereignisse involviert sind als andere?

2 Material

2.1 Untersuchungsmaterial

Die Untersuchung der *in vitro* strahleninduzierten Chromosomenaberrationen in dieser Studie erfolgte an Chromosomen aus Lymphocyten. Für die Kontrollen wurden T-Lymphocyten aus peripherem Venenblut nach Phytohämagglutinin (PHA)-Stimulation verwendet. Diese stammten von je einer männlichen und einer weiblichen gesunden Normalperson ohne bekannte Co-Morbiditäten sowie von einem männlichen Tumorpatienten, der strahlentherapiert wurde. Die Blutentnahme und *in vitro* Bestrahlung der Zellen erfolgte bei diesem Patienten vor Beginn der Radiotherapie. Der Patient wies eine normale klinische Reaktion nach Strahlentherapie und ein normales Ansprechen des Tumors auf.

Da AT-homozygote T-Zellen schwer PHA-stimulierbar sind, wurden B-Lymphocyten aus lymphoblastoiden Zelllinien von einem AT-Homozygoten und zwei obligat AT-Heterozygoten analysiert. Die Heterozygoten wiesen jeweils einen männlichen und einen weiblichen Karyotyp auf, der AT-Homozygote einen männlichen. Die Zelllinien wurden an der Klinik für Strahlentherapie der Universität Erlangen etabliert, bestrahlt und uns freundlicherweise von Frau Dr. Neubauer für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die Zelllinien bestehen aus B-Lymphocyten, die durch Transfer von Epstein-Barr-Virus immortalisiert wurden. Sie sind auch nach längerer Kulturdauer karyotypisch unverändert (Neitzel, 1986).

2.2 Reagenzien für die Kultivierung und Präparation von Lymphozyten

Tabelle 3: Für die Kultivierung von Lymphocyten verwendete Reagenzien

Reagenzien/Materialien	Hersteller	Konzentration
Colcemid	Seromed	Stammlösung mit 10µg/ml
Nährmedium RPMI 1640	Gibco BRL	RPMI 1640 mit Glutamax-Zusatz: L-Alanin und L-Glutamin
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom KG	12%
Penicillin	Biochrom KG	100 000U/ml
Streptomycin	Biochrom KG	10 000U/ml 1%
Phytohämagglutinin (PHA)	Seromed	Lyophilisiertes PHA in 5ml Aqua ad iniectionabilia (Braun) lösen
Kaliumchloridlösung (KCl)	Merck	0,56% in Aqua dest.
Eisessig	Roth	100%
Methanol	Merck	32,04g/mg

2.3 Reagenzien für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Tabelle 4: Reagenzien für die FISH

Reagenz	Hersteller	Konzentration/ Beschreibung
20xSSC	Roth Merck	87,5g NaCl 44,10g Natriumcitrat-Dihydrat 500ml Aqua dest.
Formamid pH7	Merck	
HCl	Merck	37% 1mol/l Salzsäure
Human COT-1-DNA	GibcoBRL	500µg, 1mg/ml in 10mM Tris-HCl (pH7,4), 1mM EDTA
Marvel®		Zu 99% fettfreies Milchpulver
Dextransulfat	Sigma	
Vectashield® Mounting Medium	Camon Vector Laboratories	H-1000
Paraformaldehyd		2g ad 100ml PBS
MgCl₂	Merck	1M
Pepsin	Sigma	2500units/mg Substanz 1g ad 50ml H ₂ O

Tabelle 4: Reagenzien für die FISH (Fortsetzung)

Reagenz	Hersteller	Konzentration/ Beschreibung
t-RNA	Roche	100mg ad 10ml Aqua bidest, E.coli (10µg/µl)
Phosphatpuffer		0,89g Na ₂ HPO ₄ in 10ml H ₂ O lösen (=0,5M) 0,69g NaH ₂ PO ₄ in 10ml H ₂ O lösen (=0,5M)
2xSSC pH7		50ml 20xSSC, 450ml H ₂ O
Postfixierungslösung		2,5ml 1M MgCl ₂ (50mM), 22,5ml 1x PBS, 25ml Paraformaldehyd, Fixierung der Chromosomen nach dem Pepsinverdau
RNAse-Stocklösung 109142	Böhringer	50µg RNAse A in 5ml 2xSSC, 10' kochen zum Lösen, danach aliquotieren
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Seromed (Biochrom KG)	9,55g ad 1000ml Aqua bidest

2.4 Modifizierte Nukleotide und Antikörper

Tabelle 5: Für die Markierung eingesetzte Nukleotide und für die Detektion verwendete Antikörper

Name	Abkürzung	Hersteller	Konzentration
Avidin-Fluorescein-5-isothiocyanat	FITC	Vector Laboratories	1mM
SpectrumOrange-dUTP	SO	Vysis	1mM
TexasRed-12-dUTP	TR	Molecular Probes	1mM
Biotin-16-dUTP	BIO	Roche	1mM
Digoxigenin-11-dUTP	DIG	Roche	1mM
Cyanin 5	Cy 5	Amersham	
Cyanin 5.5	Cy 5.5	Amersham	
Biotinyliertes Antiavidin	BioAA	Vector Laboratories	
Anti-Digoxigenin (in mouse)	α-dig	Roche	5,0µl/50µl Marve/4xSSC/TW
Diethylamino-Cumarin-5-dUTP	DEAC	NEN Life Science Products, Inc.	1mM

2.5 Puffer, Lösungen, Medien und Sonstiges

Tabelle 6: Weitere verwendete Lösungen

Lösung	Zusammensetzung	Beschreibung
0,4xSSC pH7	480ml H ₂ O, 20ml 20xSSC	Posthybridisierungswaschung bei 70 °C
2xSSC pH7	50ml 20xSSC, 450ml H ₂ O	Posthybridisierungswaschung
4'6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI-Lösung)	4µl DAPI Stocklösung (50mg/ml)/ 1ml Vectashield® Mounting Medium	Gegenfärbung der Chromosomen
4xSSC/TW pH7	100ml 20xSSC, 400ml H ₂ O, 250µl 0,05% Tween20	Posthybridisierungswaschung
50% Formamid/2xSSC pH7	250ml Formamid, 50ml 20xSSC, 200ml H ₂ O	Posthybridisierungswaschung bei 42 °C
Fixativ	75% Methanol, 25% Essigsäure	Fixierung der Chromosomen nach der Kultivierung
Hybridisierungslösung pH7	2g Dextransulfat (Sigma), 2ml 20xSSC, 2ml 0,5M Natriumphosphat, 5ml deionisiertes Formamid ad 10ml mit H ₂ O	Denaturierung und Hybridisierung der Sonden-DNA
Marvel®/4xSSC/TW	0,5g fettfreie Trockenmilch (Marvel®) in 5ml 4xSSC/TW lösen, 5min bei 1500U/min zentrifugieren, obere Schicht verwerfen	Blockinglösung zur Verhinderung unspezifischer Antikörperbindung an Oberflächen
Postfixierungslösung	2,5ml 1M MgCl ₂ (50mM), 22,5ml 1xPBS, 25ml Paraformaldehyd	Fixierung der Chromosomen nach dem Pepsinverdau
Pepsinlösung pH2	5ml 0,2nm HCl, 95ml H ₂ O, 500µl Pepsin	Vorbehandlung der OT vor der Hybridisierung

2.6 Geräte und Filter

Tabelle 7: Eingesetzte technische Geräte

Gerät	Bezeichnung (Hersteller)
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan 2 (Zeiss, Jena)
PCO VC45 CCD-Videokamera	PCO (Kehl)
Kulturflaschen, Zentrifugenröhrchen	(Greiner)
Objektträger	Superfrost (Menzel)
Software zur Auswertung	Isis 3 (Metasystems-Altussheim)
Thermocycler	PTC 200 (MG Research)
Lichtmikroskop	
Wärmeschrank	(Heraeus Instruments)
Zentrifugen	Laborzentrifuge 3K10 (Sigma), Labofug 200 (Heraeus), Microcentrifuge MC13 (Micon), Universal 30 RF (Hettich), Megafuge 1,0 (Heraeus)
6 MV Linearbeschleuniger	Mevatron (Siemens, Germany)

Tabelle 8: Filter

Verwendete Filter	Wellenlänge in nm (Emmissionsmaximum)
DAPI	461
FITC	518
SpO	588
TR	615
Cy 5	670
Cy 5.5	694
DEAC	580

Chromosom	FITC	SpO	TR	Cy 5	Cy5.5/DEAC
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
X					
Y					

Abbildung 1: Markierungsschema für M-FISH, modifiziert nach Senger et al., 1998

3 Methoden

3.1 Verwendete Zellen und deren Bestrahlung

3.1.1 T-Lymphocyten für Kontrollen

Die Blutproben von den klinisch unauffälligen Probanden wurden in jeweils drei Portionen aufgeteilt und vor Ansetzen der Zellkultur im unstimulierten Zustand (G_0 - Phase) bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte in einem Acrylglasphantom an einem 6 MV-Linearbeschleuniger (Mevatron, Siemens Germany) mit einer Dosisrate von 2,2Gy/min. Je eine Probe wurde mit 0,7Gy und 2Gy bestrahlt. Eine dritte Fraktion blieb von jedem Probanden unbestrahlt als Kontrolle (0Gy). Im unmittelbaren Anschluss an die Bestrahlung wurden die Proben zur Verhinderung von Reparaturvorgängen auf Eis gelegt und dann sofort Lymphocytenkulturen angesetzt.

3.1.2 Zelllinien von AT-Homozygoten und AT-Heterozygoten

Im Gegensatz zu den T-Lymphocyten erfolgte die Bestrahlung der Zelllinien in der proliferierenden Zellkultur. Die Bestrahlung wurde an der Universität Erlangen durchgeführt. Auch die B-Lymphocyten der AT-Zelllinien wurden mit je 0,7Gy und 2Gy bestrahlt. Eine Ausnahme bildete die Probe des AT-homozygoten Probanden, die zusätzlich noch mit 1,4Gy bestrahlt wurde, da die nach 2Gy-Bestrahlung analysierten Präparate keine ausreichende Mitosenzahl enthielten.

3.2 Herstellung zytogenetischer Präparate für FISH

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Lymphocytenkultur - Kontrollen

Die Kultivierung erfolgte modifiziert nach einem Standardprotokoll (Verma und Babu, 1994). In sterile Gewebekulturflaschen (Greiner) mit einem Volumen von 50ml wurden 10ml Nährmedium, 1ml Blut und 0.1ml Phytohaemagglutinin PHA-L gegeben. Die anschließende Inkubation bei 37°C und einem CO_2 -Partialdruck von 5% erfolgte

über 48h. Das Glykoprotein Phytohaemagglutinin bewirkte dabei eine Stimulation der T-Zell-Fraktion der Lymphozyten.

3.2.1.2 Kultivierung der Zelllinien in Erlangen

Die Kultivierung und Bestrahlung der Zelllinien des AT-Patienten und der AT-Heterozygoten erfolgte durch Frau Dr. S. Neubauer an der Universität Erlangen, die uns die Zellsuspensionen freundlicherweise zur Verfügung stellte. Als Nährmedium für die LCL-Suspensionskulturen wurde 80% RPMI 1640 mit Zusatz von 20% FKS, 1% L-Glutamin sowie 10000iE/ml Penicillin/ Strepomycin verwendet. Das FKS wurde vor Gebrauch 30min bei 56 °C inaktiviert. Die Kultivierung erfolgte vertikal bei 37 °C im CO₂-Brutschrank (CO₂ 5%). Der Mediumwechsel wurde abhängig von der Proliferationsrate ein bis zwei Mal pro Woche vorgenommen (Neubauer et al., 2002).

3.2.2 Präparation von Chromosomen

3.2.2.1 Colcemidbehandlung

Nach erfolgter Kultivierung der Lymphocyten über 48h wurde die Zellteilung im Stadium der Metaphase durch Zusetzen von 1µg/ml Colcemid gestoppt. Dafür mussten die Kulturflaschen 1,5h bei 37 °C inkubiert werden.

Colcemid ist ein synthetisches Derivat von Colchicin, dem Alkaloid der Herbstzeitlose. Dieser Stoff bewirkt eine Störung im Aufbau der Mikrotubuli der Zelle und verhindert somit die Fortsetzung der mitotischen Zellteilung in der Metaphase. Mitosen in diesem Stadium des Zellzyklus reichern sich infolgedessen in der Zellsuspension an.

3.2.2.2 Präparation der Metaphasechromosomen

Zunächst wurden durch vorsichtiges Schütteln die sedimentierten Zellen vom Boden der Kulturflaschen abgelöst und in 15ml Falconröhrchen überführt. Im Anschluss wurde für 5min bei 1500U/min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Die Zugabe von 10ml hypotoner Kaliumchloridlösung (0,599g KCl/100ml sterilem Aqua bidest) und eine Inkubation für 20min bei 37 °C führten eine Lyse der Erythrozy-

ten herbei (Hsu et al., 1952). Zum Anfixieren wurde vor dem erneuten Zentrifugieren 1ml Fixativ (Eisessig:Methanol = 1:3, 4°C) zugesetzt. In einem Waschvorgang konnte anschliessend eine Abtrennung von Erythrozyten und Plasmaresten vorgenommen werden. Dazu wurde der Überstand abpipettiert, mit 10ml Fixativ resuspendiert und die Suspension schließlich für 5min bei 1500U/min abzentrifugiert. Diese Waschschriffe mussten wiederholt werden, bis das Zellpellet weiß war, da zuviel Plasma später die Hybridisierung behindern würde.

Nach dem Waschen wurden die Zellen in ca. 1ml Fixativ gelöst. Sie sind im Gefrierschrank bei -20 °C über Jahre lagerfähig.

3.2.3 Auftropfen der Suspension auf Objektträger (OT)

Zur Vorbereitung wurden die OT (Menzel Superfrost) mit Seidenpapier gereinigt und in eine Küvette mit Aqua dest. in den Kühlschrank bei 4°C gestellt. Zum Auftropfen wurden die Objektträger in eine vorgewärmte feuchte Kammer gelegt, um eine gute Spreitung der Chromosomen zu erreichen. Dafür optimal sind eine Luftfeuchtigkeit von etwa 50% und eine Temperatur von 20°C (Spurbeck et al., 1996; Hliscs et al., 1997).

Bei sehr plasmahaltigen Mitosen kann nach etwa 20 Sekunden mit Fixativ nachgetropft und dadurch der Verdunstungsvorgang verlängert werden. Allerdings besteht das Risiko, dass einzelne Chromosomen versprengt werden können, weshalb meistens auf diesen Schritt verzichtet wurde. Nach Lufttrocknung der OT erfolgte die Dehydratation in der aufsteigenden Alkoholreihe. Die OT wurden dazu jeweils 3min in 70%ige, 90%ige und 100%ige Ethanollösung gestellt.

Für die FISH sollten die OT über Nacht bei 60°C im Trockenschrank verbleiben oder wenige Tage bei Raumtemperatur altern. Spätestens nach einer Woche müssen die OT jedoch zur Lagerung bei -20°C eingefroren werden, da ansonsten nur noch schlechte Hybridisierungsergebnisse entstehen.

3.3 Multicolor FISH (M-FISH)

3.3.1 Vorbehandlung der Chromosomenpräparate

Die auf die OT aufgetropften Metaphasechromosomen und Interphasekerne sind von Plasma umgeben. Diese Plasmaschicht behindert den Zutritt der fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden zur Ziel-DNA. Sie führt andererseits dazu, dass Proben-DNA im Plasma unspezifisch verbleibt, wodurch ein starker Signalhintergrund entstehen kann, der das Hybridisierungsergebnis enorm verschlechtert.

Um eine möglichst gründliche Plasmaentfernung zu erreichen, wurden die OT mit proteinverdauenden Enzymen vorbehandelt. Meist ist ein Pepsinverdau ausreichend, einige der Zellsuspensionen waren allerdings sehr plasmareich und bereiteten Probleme bei der Hybridisierung. Deshalb wurden diese OT zusätzlich zur Pepsinbehandlung vorher noch einem RNase-Verdau unterzogen.

Für diese Prozedur wurden die OT für 5min in eine Küvette mit 2xSSC bei Raumtemperatur gestellt. Von der RNase-Stocklösung wurden 5µl in 1000µl 2xSSC gelöst. Mit einer Pipette wurden je 100µl auf ein 24x60mm großes Deckgläschen getropft und der OT damit eingedeckelt. Anschließend wurden die OT bei 37°C für 10min im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen entfernt und die OT für 5min in 2xSSC gestellt, um die Reaktion zu stoppen. Schließlich wurden die OT zweimal für jeweils 5min in PBS gewaschen.

Für den Pepsinverdau wurden die OT in eine 37°C warme Pepsinlösung (100ml Aqua dest. + 1ml 1M HCl + 50µl Pepsin-Stocklösung gestellt, nach 5min herausgenommen, gespült und die Mitosen unter dem Phasenkontrastmikroskop beurteilt. Je nach Menge der verbliebenen Plasmareste wurde die Pepsinbehandlung noch um 1min bis 4min verlängert. Im Anschluß an den Pepsinverdau erfolgte ein 5minütiges Waschen in PBS. Danach wurden je 100µl Postfixierungslösung auf die OT gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckelt. So verblieben die OT für 10min bei Raumtemperatur, was eine wichtige Nachbehandlung für die Stabilisierung der Chromosomen darstellt. Zuletzt wurden die OT noch einmal für 3min in PBS gewaschen, kurz mit Aqua dest. abgespült und in der Alkoholreihe dehydriert (Liehr et al., 1995).

3.3.2 Vorbereitung der DNA-Sonden für die Hybridisierung

Sowohl die Ziel-DNA als auch die Sonden-DNA liegen bei Raumtemperatur als Doppelstrang vor. Aus diesem Grund müssen beide vor der Hybridisierung durch Denaturierung in Einzelstrangform gebracht werden. Zunächst wurde der M-FISH-Sondenmix in 24µl Dextransulfat gelöst. Dextran ist ein inertes Polymer, das die Matrix für die Sonden bildet. Zugewetztes Formamid destabilisiert die enthaltenen Wasserstoffbrückenbindungen und bewirkt somit eine Herabsetzung der Schmelztemperatur der DNA (Casey and Davidson, 1977).

Vor der eigentlichen Hybridisierung wurde die Sonden-DNA mit COT-1-DNA prähybridisiert, um unerwünschte Kreuzhybridisierungen zu verhindern und repetitive Sequenzen zu blocken, wobei den 24µl Sondenmix für einen OT 50µg COT-1-DNA zugesetzt wurden.

Für die Prähybridisierung wurden die Sonden zuerst 5min bei 75°C denaturiert, auf 4°C abgekühlt und anschließend 30min bei 37°C inkubiert. Die Sonden sollten umgehend auf die denaturierten OT aufgetragen werden.

3.3.3 Denaturierung der auf dem OT fixierten Ziel-DNA

Vor dem Aufbringen der Proben musste die auf dem OT fixierte DNA ebenfalls denaturiert werden. Dazu wurden die OT auf einer 72°C heißen Heizplatte kurz vorgewärmt und mit 70%iger Formamidlösung eingedeckt. Auf der Heizplatte wurden die OT für 3-5min belassen; eine längere Denaturierungszeit würde eine zu starke Alteration der Chromosomenstruktur bewirken.

Im Anschluß daran wurden die OT von der Heizplatte genommen und nach Entfernung der Deckgläschen direkt in auf -20°C gekühlten 70%igen Alkohol getaucht, um die Rehybridisierung der Einzelstränge zu verhindern. Nach 3min folgte die Alkoholdehydrationsreihe bei Raumtemperatur.

3.3.4 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurden 24µl denaturierte und prähybridisierte Sonden-DNA auf den denaturierten OT gegeben und mit einem 24x60mm Deckgläschen abge-

deckt. Die Abdichtung mit Rubber Cement (Fixogum®) verhinderte ein Austrocknen des OT, der in einer feuchten Kammer für 72h bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert wurde.

3.3.5 Posthybridisierungswaschungen, Sondendetektion und Gegenfärbung der Präparate

Die OT sollten nach Hybridisierung zum Schutz der lichtempfindlichen Farbstoffe in abgedunkelten Küvetten weiterbehandelt und aufbewahrt werden. Die auf die Hybridisierung folgenden Waschschriffe sollen unspezifische Bindungen vermindern und damit durch Entfernung der weniger stabilen heterologen Bindungen eine bessere Signalqualität erzielen.

Die OT wurden je 3x5min in 50%FA/SSC in einer Küvette im Wasserbad bei 42°C gewaschen. Anschliessend erfolgten drei Waschungen mit 2xSSC für je 5min bei gleicher Temperatur. Die OT wurden dann 4min in eine Küvette mit 4xSSCT bei Raumtemperatur gestellt.

Die direkt markierten Sonden sind nach dem Waschen direkt auswertbar. Indirekte Sonden müssen hingegen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern detektiert und dadurch sichtbar gemacht werden. Vor der Probendetektion werden unspezifische Bindungsstellen für die zur Detektion verwendeten Antikörper abgeblockt. Zum Absättigen dieser Bindungsstellen eignet sich fettfreie Trockenmilch (Marvel®), die in 4xSSCT gelöst wurde. Davon wurden jeweils 100µl auf ein Deckgläschen getropft und der OT damit eingedeckelt und anschließend in einer vorgewärmten feuchten Kammer für 15min bei 37°C inkubiert.

Zum Sichtbarmachen der indirekt gelabelten Sonden wurde Biotin mit Cy5 und Digoxigenin mit Cy5.5 detektiert. Dafür wurden 1µl Cy5 und 10µl Cy5.5 mit Marvel/4xSSCT angesetzt und dabei auf insgesamt 50µl aufgefüllt. Die Antikörper wurden auf ein Deckgläschen pipettiert und der OT damit eingedeckelt. In einer vorgewärmten feuchten Kammer wurden die OT für 40min bei 37°C inkubiert. Im weiteren Procedere wurden die OT dreimal für 3min in 4xSSCT in einer abgedunkelten Küvette auf dem Schüttler gewaschen. Eine Signalverstärkung kann nach dem Sandwich-Prinzip vorgenommen werden. Nach jeder Inkubation erfolgte dreimaliges Waschen in 4xSSCT.

Aufgrund der Instabilität des Farbstoffes Cy5.5 entstanden häufig Probleme. Das Fehlen eines Farbkanals machte die Auswertung dieser Metaphaseplatten unmöglich. Daher wurde im Verlauf der Experimente der Farbstoff Cy5.5 gegen direkt markierte DEAC-Sonden ausgetauscht, die keiner zusätzlichen Detektion bedurften und eine konstant gute Hybridisierungsqualität zeigten.

Nach dem letzten Waschschrift wurden die OT noch 5min in PBS auf dem Schüttler gewaschen, kurz mit Aqua dest. abgespült und in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern, wurde der hybridisierte und detektierte OT mit ca. 20µl Antifade (Vectashield®) eingedeckelt. Zum Sichtbarmachen der Chromosomen setzt man dem Antifade den Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4'6'-Diamidino-2-Phenylindol) zu. Durch die DAPI-Gegenfärbung entsteht ein der Giemsaänderung ähnliches Bänderungsmuster, das eine Identifizierung der Chromosomen ermöglicht. Der gegengefärbte OT konnte sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Der OT kann einige Tage bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt werden. Danach ist das Einfrieren und Lagern bei -20 °C zu empfehlen.

3.4 Aufnahme der Hybridisierungsergebnisse und Auswertung

Die Mikroskopie der fluoreszenzgefärbten Präparate erfolgte mit einem Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena) mit einem Sechsfach-Filter (DAPI, FITC, SpO, TR, Cy 5, Cy 5.5 bzw. DEAC).

Mit einer an das Mikroskop gekoppelten PCO VC45 CCD-Kamera erfolgte die Aufnahme der Bilder. Da zwei der 6 Farben nicht im sichtbaren Bereich lagen, konnte die Auswertung nicht direkt am Mikroskop erfolgen, sondern am PC anhand der aufgenommenen Bilder.

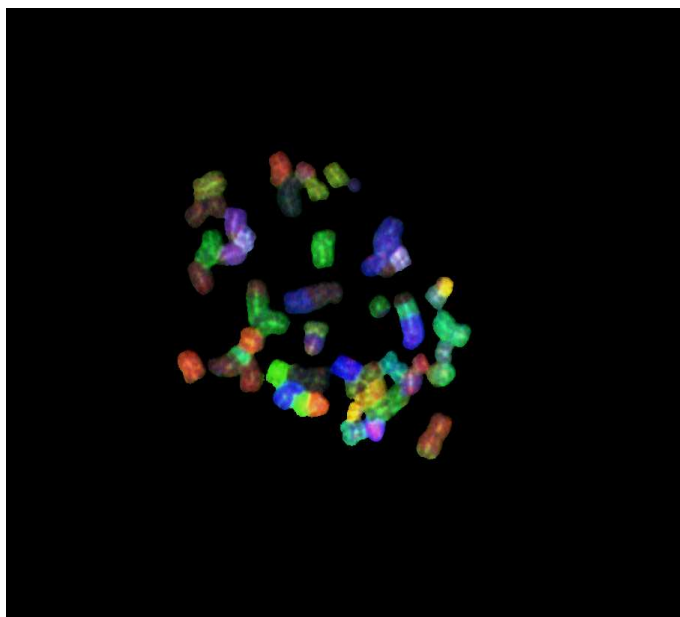


Abbildung 2: Beispiel für eine Metaphaseplatte nach M-FISH-Hybridisierung: dargestellt eine MP des AT-Homozygoten nach Bestrahlung mit 1,4Gy mit folgender Karyotypformel, die komplexe chromosomale Aberrationen (CCR) enthält: $t(1^*;3)$, B'' in Chromosom 1, $t(2;5^*)+t(2^*;5)+ace2$, $t(3^*;9)+dic(9;14)+ace(7;9)+t(5^*;7)+dic(X^*;7^*;5)$. Bei der Karyotypformel handelt es sich um die bei dieser Studie verwendete Nomenklatur, die nicht der ISCN entspricht. Klassifiziert wurden einzelne Aberrationstypen wie Translokationen (t), Dicentrische (dic), Acentrische (ace) und Doppelstrangbrüche (B''), wobei die zum jeweiligen Chromosom gehörenden Zentromere mit * gekennzeichnet wurden

Das Softwareprogramm „Isis“ der Firma MetasystemsGmbH (Altlussheim) ermöglichte die Dokumentation, Bearbeitung und Auswertung des Bildmaterials. Die sechs verschiedenen Farbkanäle werden anhand von Profilen entsprechend der Emissionsspektren der Fluorophore gespeichert. Den einzelnen Fluoreszenzfarben wird ein Grauwert zugeordnet, den das Programm in eine Pseudofarbe umwandelt. Die Chromosomen oder Fragmente können also anhand der Kombination der Fluoreszenzfarben in der Originalmetaphase sowie im Karyogramm, anhand der Profile der Fluorophore und mit Hilfe der rechnerisch zugeordneten Pseudofarben identifiziert werden. Die Auswertung konnte mittels Software beispielsweise durch Hintergrundkorrektur und Signalverstärkung der Fluoreszenzen optimiert und erleichtert werden.

3.4.1 Aberrationsanalyse

Pro Bestrahlungsstufe und Proband wurden mindestens 100 Metaphasen (zwischen 100 und 159) karyotypisiert und auf chromosomale Aberrationen hin untersucht. Das entspricht mindestens 300 analysierten Metaphaseplatten pro Person und damit

mindestens ca. 4600 Chromosomen je Person und Bestrahlungsstufe. Dabei wurden die entsprechenden Aberrationstypen und daran beteiligten Chromosomen im Detail charakterisiert. Die beobachteten Rearrangements wurden eingeteilt in nichtreziproke Translokationen, reziproke Translokationen, Dizentrische, Inversionen, Insertionen, Ringchromosomen sowie komplexe chromosomale Rearrangements (CCR), wobei diese Nomenklatur nicht der ISCN entspricht.

CCR bestehen laut Definition aus mindestens zwei beteiligten Chromosomen mit drei oder mehr Brüchen (Savage and Simpson, 1994). Jedes Chromosom bzw. Fragment, das aus zwei oder mehr verschiedenen Chromosomen bestand, konnte anhand des Farbwechsels erkannt werden. Jeder Farbwechsel wurde dabei als ein Bruchereignis pro involviertes Chromosom gewertet. Die Häufigkeit der Bruchereignisse pro Metaphase ergab sich, indem einfache DSB bzw. isolierte acentrische Fragmente als je ein Bruch im betroffenen Chromosom gewertet wurden. Ebenso zählten für alle Translokationen sowie Dicentrischen je ein Bruchereignis pro involviertes Chromosom. Bei Ringchromosomen und Inversionen ergaben sich je zwei Brüche pro beteiligtes Chromosom. Zur Identifikation von Ringen und dizentrischen Chromosomen diente zusätzlich das invertierte DAPI-Bild. Bei allen komplexen Umbauten wurde die Häufigkeit der Bruchereignisse anhand der mindestens notwendigen Brüche, die als Voraussetzung für eine bestimmte Aberration notwendig sind, beziffert.

Die Gesamtzahl der Bruchereignisse pro Patient bzw. Kontrolle wurde addiert und durch die Zahl der analysierten Metaphaseplatten dividiert. Daraus ergibt sich die durchschnittliche Bruchrate pro Mitose (B/M), wobei die Bruchrate der unbestrahlten Proben jeweils subtrahiert wurde, um den Einfluss spontaner Basisaberrationen zu korrigieren.

3.4.2 Ausgewertete Parameter

Eine exakte Dokumentation der o.g. Daten erfolgte auf Datenblättern immer für den jeweiligen Probanden und Bestrahlungsstufe.

Durch weitere Bearbeitung der Rohdaten wurde das prozentuale Auftreten von normalen bzw. aberranten MPP berechnet und jeweils zwischen AT-Homozygotem, AT-Heterozygoten und Kontrollen verglichen. Desweiteren wurden für jeden Probanden

und Bestrahlungsstufe die durchschnittliche Bruchrate pro Mitose (B/M) sowie die durchschnittliche Rate an CCR/M berechnet, graphisch dargestellt und verglichen.

Die Einteilung der Aberrationstypen erfolgte in o.g. Gruppen, wobei sehr selten aufgetretene Umbauten wie Ringe und Inversionen in einer Gruppe zusammengefasst wurden. Nachfolgend wurde je Probe und Bestrahlungsstufe die prozentuale Verteilung der Aberrationstypen ausgerechnet. Für die 3 Kontrollen wurden die berechneten Prozentwerte je Aberrationstyp in der gleichen Bestrahlungsstufe als Durchschnittswert für die Gruppe Kontrollen zusammengefasst. Analog wurde mit den Werten der beiden AT-Heterozygoten verfahren und letztlich die prozentuale Häufigkeit der aufgetretenen Aberrationstypen in den 3 Gruppen Kontrollen, AT-Homozygoter und AT-Heterozygote untereinander verglichen sowie graphisch dargestellt.

Außerdem wurde der Anteil von Chromosomenbrüchen, die an der Formation von CCR beteiligt waren, mit der absoluten Anzahl von Chromosomenbrüchen in Relation gesetzt und verglichen. Damit sollte unter Einbeziehung aller Chromosomen überprüft werden, ob CCR nach Strahleneinwirkung bei hypersensitiven Probanden gehäuft auftreten, wie von Neubauer et. al. (1997) mittels 3-Farb-FISH beschrieben wurde.

Desweiteren wurden pro Fall und Bestrahlungsstufe die absolute Anzahl der Brüche pro einzelner analysierter MP aufgelistet, und berechnet, in wieviel Prozent der Metaphaseplatten „n“ Brüche pro MP auftraten und wieder in den jeweiligen Gruppen und Strahlendosen verglichen.

Um die Aussagekraft der 3-Farb-FISH und der M-FISH-Methode gegenüberzustellen, wurde die jeweils aufgetretene Zahl von Chromosomenbrüchen pro Mitose (B/M) als Parameter gewählt. Es wurden dafür die durch Analyse der Chromosomen eins, zwei und vier erfassten Aberrationen dem Wert nach Analyse des gesamten Chromosomensatzes mittels M-FISH gegenübergestellt. Dabei wurde jeweils der 0Gy-Wert subtrahiert, wo dieser nicht Null war, um den Einfluss der spontanen Basisbruchrate auszuschalten. Nach dieser Vorgehensweise wurde eine Auswertung aller pro Proband und Bestrahlungsstufe verfügbaren MPP vorgenommen.

Zusätzlich wurde, um den Aussagewert nach Analyse einer geringeren Zahl von Metaphasen mit dem Ziel der Reduktion des Arbeitsaufwandes zu prüfen, mit den jeweils 50 ersten MPP jedes Datenblattes analog verfahren und anschliessend die so ermittelte Bruchrate pro Mitose mit der Bruchrate, die nach Auswertung der gesam-

ten je Proband und Bestrahlungsstufe verfügbaren Zahl an MPP errechnet wurde, verglichen.

3.5 Bruchereignisse bei einzelnen Chromosomen

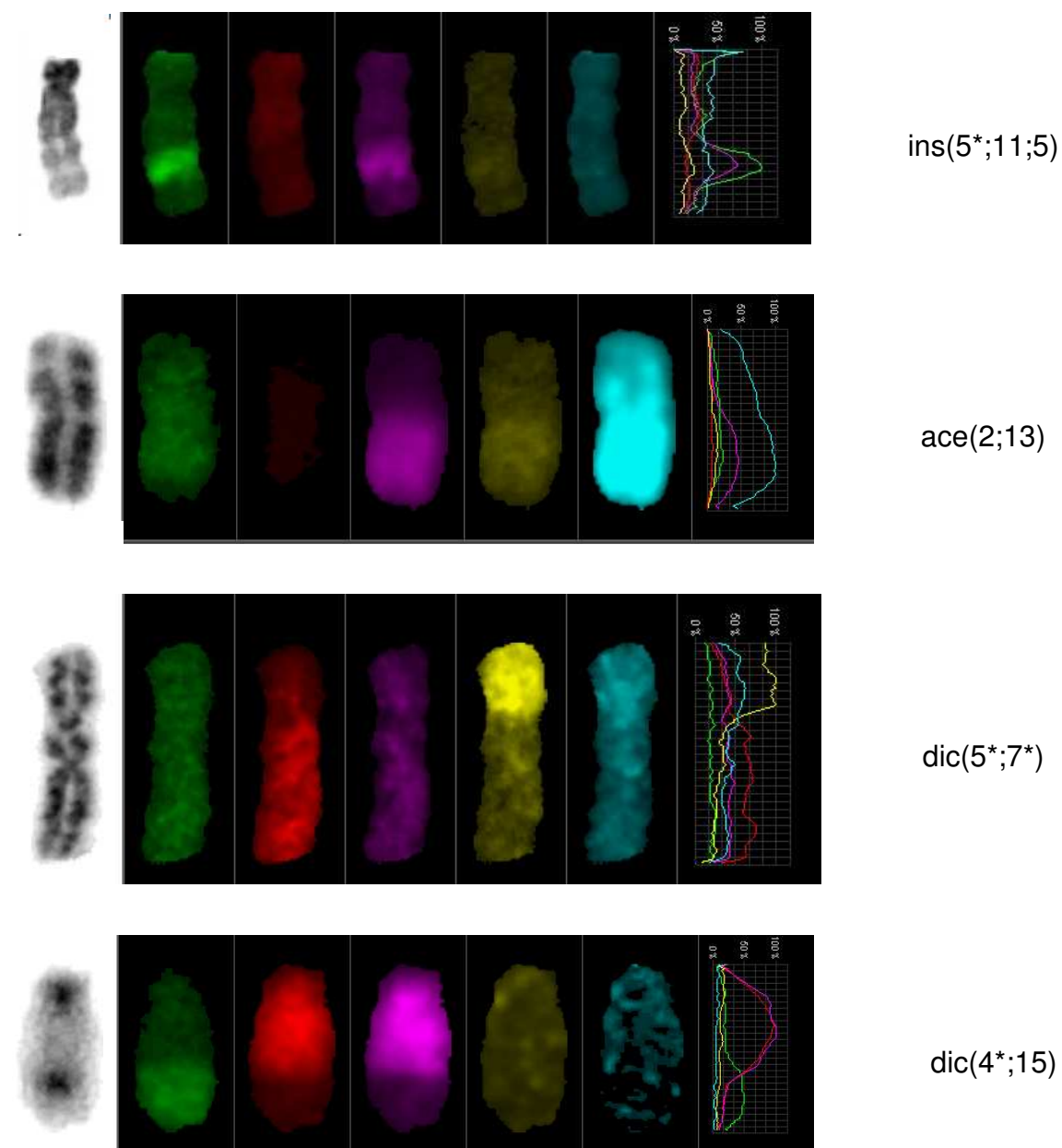
Zur Untersuchung der Häufigkeit von Chromosomenbrüchen wurden die Probanden zunächst in drei Gruppen (Kontrollen, AT-Heterozygote und AT-Homozygoter) eingeteilt. Mittels ANOVA wurde untersucht, ob sich hierbei eine signifikante Gruppe-Bruchhäufigkeit-Interaktion zeigt. Für die Datenanalyse und Statistik wurde SPSS 11.5 für Windows (SPSS, Inc. 1989-2001) verwendet.

Die Anzahl der tatsächlich aufgetretenen Chromosomenbrüche pro individuellem spezifischem Chromosom in jeder Probe und Bestrahlungsstufe wurde bestimmt. Es sollte dargestellt werden, ob eine zufällige Verteilung vorliegt, oder bestimmte Chromosomen häufiger bzw. seltener in Bruchereignisse involviert sind als andere. Problem hierbei ist, dass die menschlichen Chromosomen aufgrund ihrer unterschiedlichen Länge jeweils einen dementsprechend unterschiedlichen DNA-Gehalt aufweisen. Dies muss bei der Analyse berücksichtigt werden. Zur Abschätzung des DNA-Gehaltes der einzelnen Chromosomen wurden Werte aus der Literatur verwendet (Stephens et al., 1990). Zudem wurde für jedes der 24 verschiedenen Chromosomen der prozentuale Anteil an Bruchereignissen berechnet. Hierfür wurde für die Gruppen der Kontrollen und Heterozygoten zunächst der Median für die einzelnen Chromosomen und für das Gesamtgenom bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 Darstellung der unterschiedlichen erfassten Aberrationstypen

Eine Übersicht über die erfassten strukturellen Chromosomenaberrationen bietet nachfolgende Abbildung:



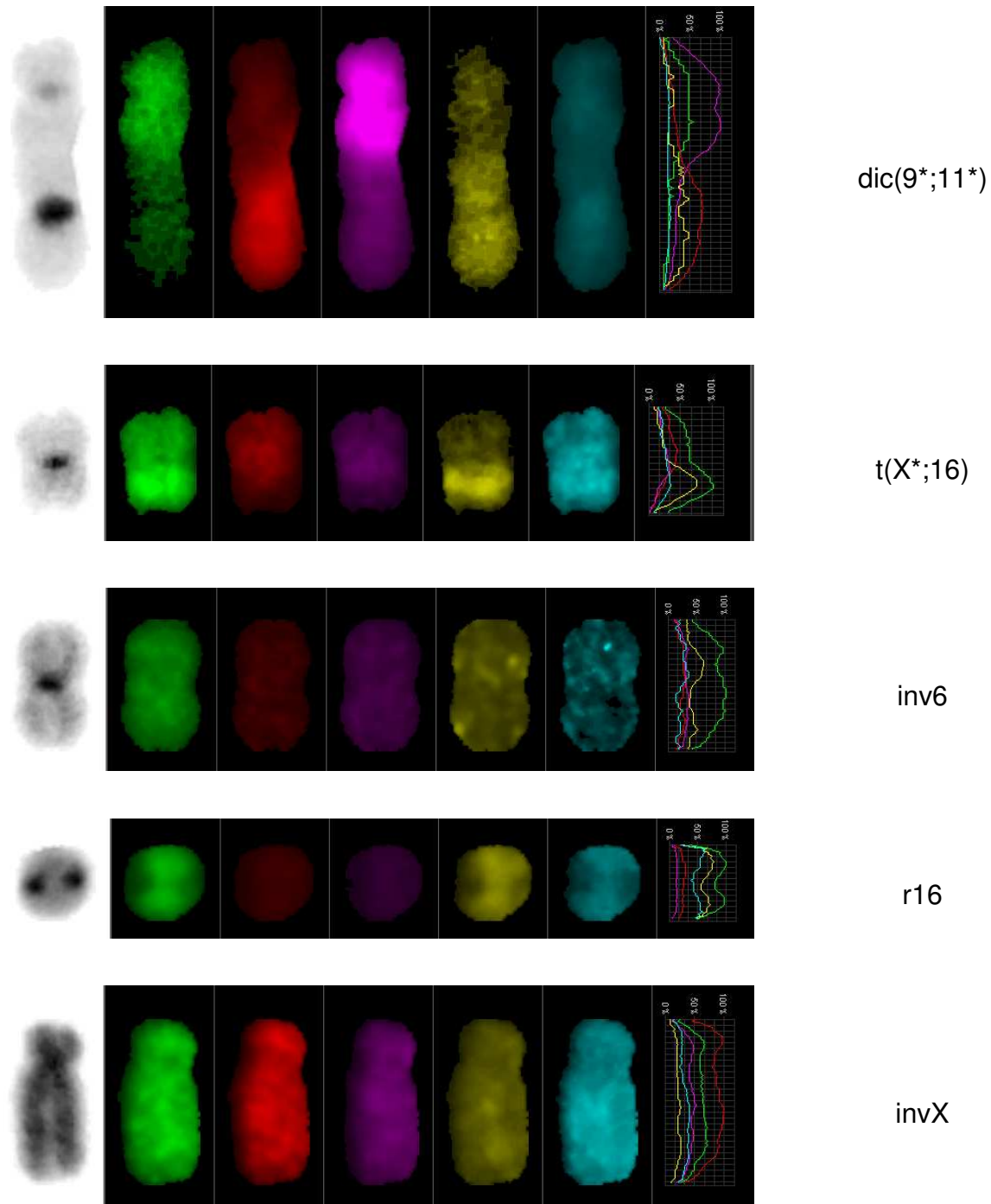


Abbildung 3: M-FISH-Färbung einzelner aberranter Chromosomen, wobei von links nach rechts jeweils das invertierte DAPI-Bild und anschliessend die fünf Farbkanäle FITC(=grün), Spectrum Orange(=rot), Texas Red(=lila), Cy5(=gelb) und Cy5.5(=blau) dargestellt sind. Anhand der Farbkombinationen können die entsprechenden Chromosomen wie in Abb.1 aufgelistet identifiziert werden. Dabei dienen die hier abgebildeten Aberrationen mit den jeweils konkret beteiligten Chromosomen als Illustration einzelner Aberrationstypen wie Insertionen(ins), Dicentrische(dic), Acentrische(ace), Ringe(r), Inversionen(inv) sowie Translokationen(t). Die zum jeweiligen Chromosom gehörenden Zentromere wurden mit * in der Nomenklatur gekennzeichnet

4.2 Mögliche Parameter zur Identifikation erhöhter Strahlensensitivität

Mittels M-FISH wurden insgesamt 2175 Metaphasen karyotypisiert und ausgewertet. 352 Metaphasen wurden von dem AT-Homozygoten, 779 von den beiden AT-Heterozygoten und 1044 MPP von den Kontrollen analysiert. Bei 46 Chromosomen pro MPP wurden somit über 100.000 Chromosomen auf chromosomale Umbauten hin untersucht.

Tabelle 9: Übersicht über die Anzahl der je Proband und Bestrahlungsstufe ausgewerteten MP bei Kontrollen, AT-Heterozygoten (AT-Het 1, AT-Het 2) und AT-Homozygotem (AT-Hom)

Proband	Strahlendosis 0Gy	Strahlendosis 0,7Gy	Strahlendosis 2,0Gy bzw. 1,4Gy bei AT-Homozygotem
Kontrolle 1	112	103	156
Kontrolle 2	107	121	132
Kontrolle 3	102	107	104
AT-Het 1	132	107	141
AT-Het 2	159	140	100
AT-Hom	124	116	112

4.2.1 Häufigkeit von Aberrationen

4.2.1.1 Unbestrahlte Proben (0Gy)

In den unbestrahlten Proben der Kontrollen 1 und 2 konnten keine spontanen Aberrationen oder CCR identifiziert werden. In der Kontrolle 3 fanden sich drei reziproke Translokationen, ein dicentrisches Chromosom und zwei DSB, was insgesamt 10 spontanen Bruchereignissen entspricht. Daraus ergibt sich folgende prozentuale Verteilung für normale Zellen ohne Aberrationen: Kontrolle 1: 100%, Kontrolle 2: 100% und Kontrolle 3: 94,1%. Bei den unbestrahlten Zellen des AT-Heterozygoten 1 (AT-Het 1) konnten zwei reziproke Translokationen und vier DSB nachgewiesen werden;

eine reziproke Translokation und drei Brüche fanden sich bei dem AT-Heterozygoten 2 (AT-Het 2). Dies entspricht 95,5% bzw. 97,5% normalen Metaphasen ohne Aberrationen. In den 0Gy-Metaphasen des AT-Homozygoten (AT-Hom) lagen insgesamt fünfzehn DSB vor, d.h. in 92,7% der Zellen konnten keine Veränderungen nachgewiesen werden. Die spontane Basisbruchrate lag bei 0,121 B/M, was dem höchsten Wert in der 0Gy-Bestrahlungsstufe entspricht. Komplexe chromosomale Umbauten fanden sich in keiner der unbestrahlten Proben.

4.2.1.2 Bestrahlung mit 0,7Gy

Nach *in vitro* Bestrahlung mit 0,7Gy beinhalteten 9,7% der Zellen der Kontrolle 1, 12,4% in Kontrolle 2 und 17,8% der Zellen in Kontrolle 3 chromosomale Umbauten. Die beiden AT-Heterozygoten wiesen in 44,9% bzw. 22,1% der Metaphasen Aberrationen auf. Die höchste Rate an chromosomalen Veränderungen ergab die Auswertung bei dem AT-Homozygoten mit 64,7% aberranten MPP nach 0,7Gy-Bestrahlung.

4.2.1.3 Bestrahlung mit 2,0Gy bzw. 1,4Gy

Nach einer Strahlendosis von 2,0Gy ergab sich folgende Prozentverteilung für aberrante Metaphasen: 43,6% Kontrolle 1, 40,9% Kontrolle 2, 57,7% Kontrolle 3, 44,7% AT-Het 1 und 65% AT-Het 2. Nach Bestrahlung mit 1,4 Gy konnten in 92% der Zellen des AT-Homozygoten Aberrationen nachgewiesen werden; dieser Prozentsatz wäre nach Verwendung einer 2,0Gy-Dosis wie bei den anderen Proben wohl noch höher ausgefallen. Nach Radiatio mit 2,0Gy ergab sich bei dem AT-Homozygoten ein sehr niedriger Mitoseindex. Dies machte eine Auswertung bei mindestens 100 MP in dieser Bestrahlungsstufe unmöglich. Daraufhin wurde eine Bestrahlungsstufe von 1,4Gy verwendet, da hierbei noch ausreichend viele Mitosen vorhanden waren.

4.2.1.4 Aberrationshäufigkeit bei Zusammenfassung der Resultate in drei Gruppen

Die Ergebnisse der drei Kontrollen wurden zusammengefasst dargestellt und bewertet. Ebenso wurde mit den von den beiden AT-Heterozygoten erhobenen Daten ver-

fahren. Alle Werte wurden zudem um den Nullwert korrigiert. Nach *in vitro* Bestrahlung mit einer Dosis von 0,7Gy enthielten 13,3% der Zellen der Kontrollen, 33,5% der Zellen der AT-Heterozygoten und 64,7% der Zellen des AT-Homozygoten Aberrationen. Nach Applikation von 2,0Gy ergab sich folgende prozentuale Verteilung: 47,4% der Kontrollzellen, 54,8% der Zellen der AT-Heterozygoten und 92% der Zellen des AT-Patienten präsentierten sich mit chromosomalen Veränderungen, wobei die Zellen des AT-Homozygoten mit 1,4Gy bestrahlt wurden. Eine detaillierte Auflistung der Resultate findet sich in Tabelle 10.

Tabelle 10: Übersicht über alle ausgewerteten Metaphasen (MP) bei Zusammenfassung der Probanden in 3 Gruppen in den jeweiligen Bestrahlungsstufen: Kontrollen, AT-Heterozygote (AT-Het) und AT-Homozygoter (AT-Hom): Gesamtzahl untersuchter MP, prozentualer Anteil normaler und aberranter MP, durchschnittliche Anzahl an Brüchen pro Mitose (B/M) und komplexen chromosomalen Rearrangements pro Mitose (CCR/M). Alle 0,7Gy und 2,0Gy (1,4Gy)-Werte wurden um den Nullwert korrigiert, wo dieser nicht 0,00 war

Probe & Bestrahlungsstufe	Anzahl der MP	Normale MP (%)	Aberrante MP (%)	B/M	CCR/M
Kontrollen 0Gy	321	98,0	2,0	0,033	0,00
Kontrollen 0,7Gy	331	86,7	13,3	0,252	0,02
Kontrollen 2,0Gy	392	52,6	47,4	1,317	0,07
AT-Het 0Gy	291	96,5	3,5	0,046	0,00
AT-Het 0,7Gy	247	66,5	33,5	0,815	0,05
AT-Het 2,0Gy	241	45,2	54,8	2,046	0,17
AT-Hom 0Gy	124	92,7	7,3	0,121	0,00
AT-Hom 0,7Gy	116	35,3	64,7	1,939	0,12
AT-Hom 1,4Gy	112	8,0	92,0	6,495	0,83

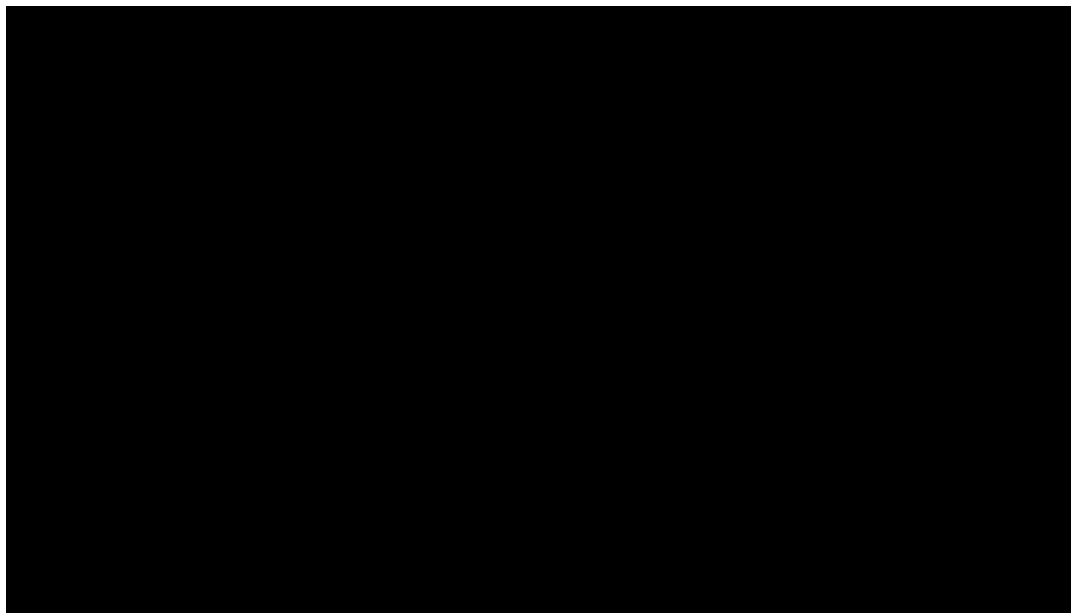


Abbildung 4: Darstellung der durchschnittlichen Bruchrate pro Mitose (B/M) pro Proband und Bestrahlungsstufe bei Zusammenfassung in die 3 Gruppen: Kontrollen, AT-Heterozygote (AT-Het) und AT-Homozygoter (AT-Hom)

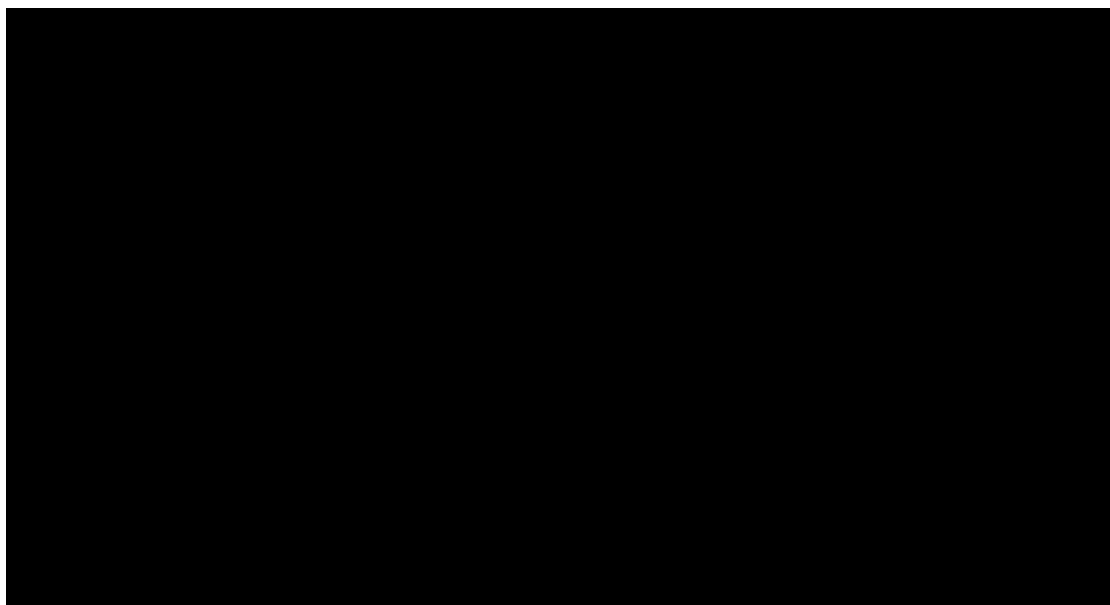


Abbildung 5: Darstellung der durchschnittlichen Rate an komplexen chromosomalen Rearrangements pro Mitose (CCR/M) pro Proband und Bestrahlungsstufe bei Zusammenfassung in die 3 Gruppen: Kontrollen, AT-Heterozygote (AT-Het) und AT-Homozygoter (AT-Hom)

4.2.2 Durchschnittliche Bruchrate pro Mitose (B/M)

Als Maß für eine gesteigerte Strahlensensitivität diente in dieser Studie die Bruchrate pro Mitose, die sich aus dem Quotienten von absoluter Anzahl der DSB und Zahl der ausgewerteten Metaphasen ergibt. Die Basisbruchraten wurden jeweils in den nicht bestrahlten Proben bestimmt. Der AT-Patient zeigte in beiden Bestrahlungsstufen die höchste durchschnittliche Bruchrate mit 1,94 B/M nach 0,7Gy und 6,50 B/M nach 1,4Gy-Applikation und konnte klar von Heterozygoten und Kontrollen abgegrenzt werden. Auch in den Mitosen der AT-heterozygoten Mutationsträger fand sich eine gesteigerte Zahl von Chromosomenbrüchen nach Radiatio im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen. Allerdings konnten nur nach 0,7Gy-Bestrahlung beide Heterozygoten aufgrund einer erhöhten Bruchrate pro Mitose mit 1,182 bei AT-Het 1 und 0,448 bei AT-Het 2 von den Kontrollen abgegrenzt werden. Die Auswertung der Bruchraten nach Bestrahlung mit 2,0Gy erbrachte hingegen widersprüchliche Ergebnisse, da Kontrolle 3 mit 1,719 B/M mehr Bruchereignisse als AT-Het 1 mit 1,223 B/M aufwies. Demzufolge war anhand der alleinigen Betrachtung der B/M keine klare Differenzierung zwischen Heterozygoten und Kontrollen möglich.

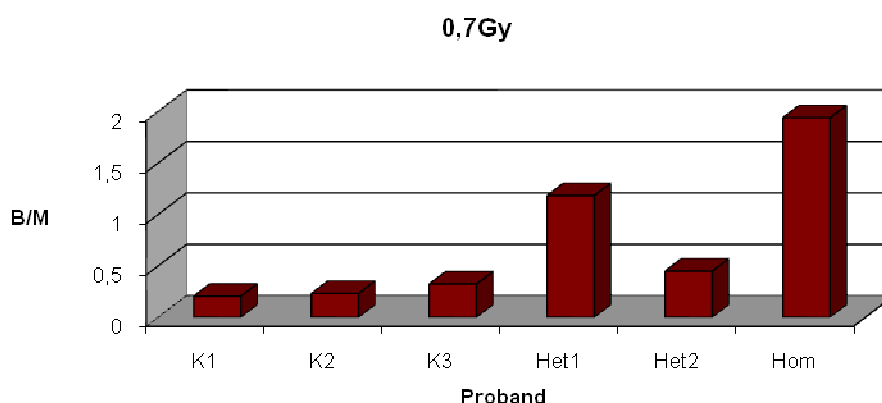


Abbildung 6: Darstellung der durchschnittlichen Bruchrate pro Mitose (B/M) nach Bestrahlung mit 0,7Gy bei Kontrolle 1 (K1); Kontrolle 2 (K2); Kontrolle 3 (K3); AT-Heterozygoter 1 (Het1); AT-Heterozygoter 2 (Het2) und AT-Homozygoter (Hom)

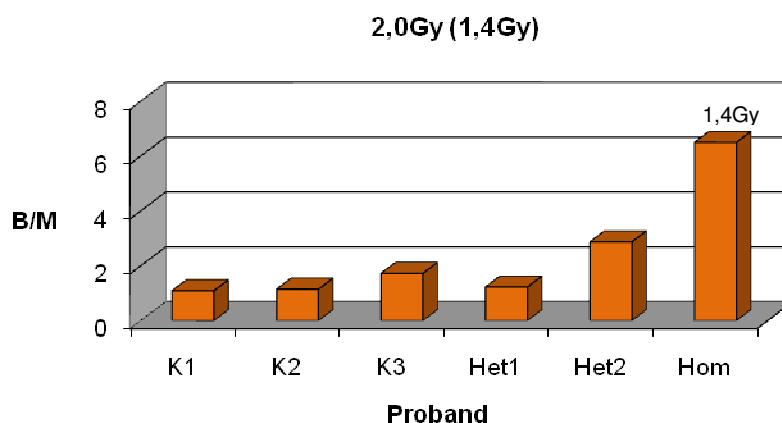


Abbildung 7: Darstellung der durchschnittlichen Bruchrate pro Mitose (B/M) nach Bestrahlung mit 2,0 bzw. 1,4Gy bei Kontrolle 1 (K1); Kontrolle 2 (K2); Kontrolle 3 (K3); AT-Heterozygoter 1 (Het1); AT-Heterozygoter 2 (Het2) und AT-Homozygoter (Hom)

Im Anschluß wurde geprüft, ob sich auch statistisch signifikante Unterschiede in der Chromosomenbruchhäufigkeit nachweisen lassen. Hierfür wurden die Probanden in drei Gruppen eingeteilt: Kontrollen (Kontrolle 1,2,3), Heterozygote (AT-Het 1, AT-Het 2) und Homozygoter (AT-Hom). Die Bruchhäufigkeiten für die einzelnen Probanden sind in nachfolgenden Tabellen für jede Bestrahlungsintensität getrennt dargestellt.

Tabelle 11: Absolute Anzahl der Chromosomenbrüche in der 0Gy-Bestrahlungsstufe bei den einzelnen Chromosomen

Chromosom	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	AT-Het 1	AT-Het 2	AT-Hom
1	0	0	1	1	1	3
2	0	0	0	0	0	3
3	0	0	1	0	0	0
4	0	0	1	0	0	0
5	0	0	0	1	1	0
6	0	0	0	2	0	0
7	0	0	1	0	0	0
8	0	0	0	3	0	0
9	0	0	3	0	0	0
10	0	0	0	0	0	1
11	0	0	1	0	0	0
12	0	0	1	0	1	1
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	1
15	0	0	0	0	0	1
16	0	0	1	0	1	1
17	0	0	0	1	0	1
18	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	2
21	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0
X	0	0	0	0	1	1
Y	0	0	0	0	0	0
Summe	0	0	10	8	5	15

Tabelle 12: : Absolute Anzahl der Chromosomenbrüche in der 0,7Gy-Bestrahlungsstufe bei den einzelnen Chromosomen

Chromosom	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	AT-Het 1	AT-Het 2	AT-Hom
1	3	1	3	10	4	24
2	1	3	1	12	11	27
3	1	1	1	5	4	15
4	2	2	2	12	3	15
5	0	7	0	6	4	11
6	3	1	3	9	4	13
7	0	0	0	15	5	15
8	1	1	1	8	0	14
9	3	2	3	9	2	13
10	1	0	1	4	2	12
11	0	0	0	6	2	9
12	0	2	0	7	3	11
13	0	1	0	5	5	4
14	0	0	0	4	1	6
15	0	0	0	5	4	10
16	2	1	2	5	3	7
17	2	0	2	2	0	3
18	0	0	0	2	3	2
19	2	2	2	2	0	6
20	0	1	0	0	1	4
21	0	1	0	1	0	1
22	0	0	0	1	2	3
X	0	2	0	2	4	14
Y	0	0	0	1	0	0
Summe	21	28	21	133	67	239

Tabelle 13: Absolute Anzahl der Chromosomenbrüche in der 2Gy- bzw. 1,4Gy-Bestrahlungsstufe bei den einzelnen Chromosomen

Chromosom	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	AT-Het 1	AT-Het 2	AT-Hom
1	9	9	10	22	31	78
2	12	10	14	11	23	60
3	9	9	18	16	24	46
4	5	10	16	15	13	40
5	10	9	13	6	11	41
6	16	4	11	9	14	31
7	9	11	7	5	10	36
8	6	7	12	14	12	47
9	13	7	10	5	12	28
10	8	10	9	6	11	36
11	9	6	14	7	14	52
12	8	13	5	11	17	42
13	5	5	2	7	8	22
14	8	7	6	5	11	28
15	5	9	8	10	12	31
16	11	3	3	7	17	23
17	8	2	3	8	9	23
18	6	2	9	4	5	12
19	0	2	1	4	5	18
20	3	3	5	1	3	12

Tabelle 13: Absolute Anzahl der Chromosomenbrüche in der 2Gy- bzw. 1,4Gy-Bestrahlungstufe bei den einzelnen

Chromosomen (Fortsetzung)

Chromosom	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	AT-Het 1	AT-Het 2	AT-Hom
21	4	2	2	1	6	6
22	2	2	6	3	2	6
X	3	9	3	3	20	14
Y	1	0	2	1	0	9
Summe	170	151	189	181	290	741

Es fand sich eine kontinuierliche Zunahme der Chromosomenbrüche mit zunehmender Bestrahlungsintensität sowie eine auf das Gesamtgenom bezogene höhere Häufigkeit von Chromosomenbrüchen bei dem AT-Homozygoten und den Heterozygoten im Vergleich zu den Kontrollen. Die Interaktion zwischen Gruppe und Bruchhäufigkeit war in allen Bestrahlungsintensitäten signifikant (ANOVA; 0Gy: $p=0.004$; 0,7Gy: $p < 0.0001$; 2,0Gy (1,4Gy): $p < 0.0001$). Der Unterschied zwischen Kontrollen und Heterozygoten war hierbei für 0,7Gy und 2,0Gy signifikant (0Gy: n.s.; 0,7Gy: $p < 0.0001$; 2,0Gy: $p=0.007$, jeweils T-Test für unverbundene Stichproben).

Tabelle 14: Median der absoluten Anzahl der Chromosomenbrüche im Gesamtgenom bei Kontrollen und Heterozygoten sowie des Homozygoten in den drei Bestrahlungsintensitäten

	0Gy	0,7Gy	2Gy (1,4Gy)
Kontrollen	0	21	170
Heterozygote	6,5	100	235,5
Homozygoter	15	239	741

4.2.3 Prozentuale Verteilung der einzelnen Aberrationstypen

Die gefundenen strukturellen Chromosomenaberrationen wurden in bestimmte Aberrationstypen eingeteilt und in fünf Gruppen zusammengefasst: reziproke Translokationen, nichtreziproke Translokationen, dicentrische Chromosomen, CCR und alle übrigen seltenen Aberrationen wie Inversionen und Ringe in die Kategorie ‚andere‘. Mit 37,1% bildeten die reziproken Translokationen in der 0,7Gy-Stufe den Hauptteil bei den Kontrollen, während die Rate an nichtreziproken Translokationen 17,1% betrug. Bei dem AT-Homozygoten fanden sich mit 20,6% mehr nichtreziproke Translokationen als reziproke Translokationen, deren Anteil 14,3% ausmachte. Es fiel auf, dass der Anteil an CCR mit rund 20% in allen drei Gruppen nach Applikation von

0,7Gy etwa gleich war. Der ermittelte Anteil an dicentrischen Chromosomen war bei dem AT-Patienten mit 39,7% fast doppelt so hoch wie bei den Kontrollen mit 22,9%. Im Hinblick auf die Häufigkeit einzelner Aberrationstypen in der 2,0Gy- Bestrahlungsstufe (1,4Gy beim AT-Homozygoten) zeigten sich in den untersuchten Gruppen ebenfalls deutliche Unterschiede. Mit 38,8% bildeten reziproke Translokationen bei den Kontrollen den Hauptanteil, während lediglich 13,2% nichtreziproke Translokationen auftraten, womit eine Paralle zur 0,7Gy-Stufe gezogen werden konnte. Bei dem AT-Patienten überwogen deutlich die nichtreziproken Translokationen mit 24%, wobei sich im Gegenzug die reziproken Translokationen auf 16,9% nach Bestrahlung mit 1,4Gy verminderten. Der Anteil an CCR war bei den AT-Heterozygoten mit 26,7% etwa doppelt so hoch wie bei den Kontrollen, wo er bei 13,7% lag. Er vergrößerte sich nochmals auf 41,3% CCR bei dem AT-Homozygoten, was etwa dem dreifachen Wert im Vergleich zu den Kontrollen entsprach. Parallel dazu verminderte sich der Anteil an dicentrischen Chromosomen, der bei Kontrollen und Heterozygoten mit 34,2% bzw. 30,4% ähnlich hoch war, im Vergleich zu dem AT-Patienten, der 17,3% dicentrische Chromosomen aufwies. Inversionen, Insertionen, Deletionen und Ringe hingegen präsentierten lediglich einen Anteil von 0,4% der Aberrationen bei dem AT-Patienten. Die prozentuale Verteilung der einzelnen Aberrationstypen nach *in vitro* Bestrahlung wurde in nachfolgenden Graphiken veranschaulicht.

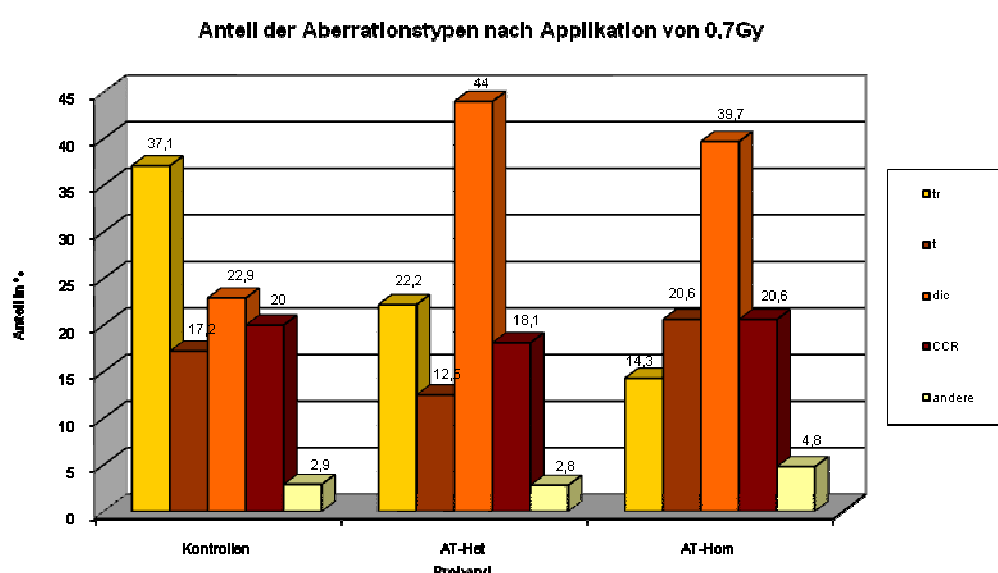


Abbildung 8: Anteil der unterschiedlichen Aberrationstypen bei Kontrollen, AT-Heterozygoten (AT-Het) und AT-Homozygotem (AT-Hom) nach Bestrahlung mit 0,7Gy. (tr: reziproke Translokationen; t: nichtreziproke Translokationen; dic: dicentrische Chromosomen; CCR: komplexe chromosomale Rearrangements; andere: Inversionen, Insertionen, Ringchromosomen und tricentrische Chromosomen zusammengefasst)

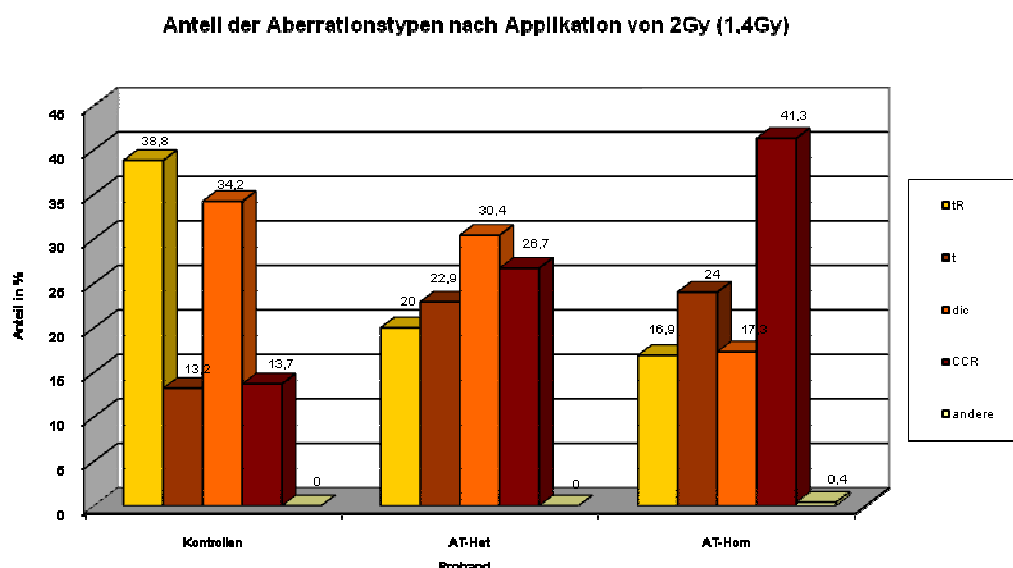


Abbildung 9: Anteil der unterschiedlichen Aberrationstypen bei Kontrollen, AT-Heterozygoten (AT-Het) und AT-Homozygotem (AT-Hom) nach Bestrahlung mit 2Gy. Die Zellen des AT-Homozygoten wurden mit einer reduzierten Strahlendosis von 1,4Gy bestrahlt, da nach 2Gy-Bestrahlung kein ausreichender Mitoseindex für die Auswertung von mindestens 100 MPP zur Verfügung stand

Die Werte der drei Kontrollen und der zwei AT-Heterozygoten wurden jeweils in Gruppen zusammengefasst. Hierbei muss herausgestellt werden, dass sich teilweise grosse interindividuelle Unterschiede fanden. So ergab sich beispielsweise nach Bestrahlung mit 0,7Gy bei den Kontrollen folgende Verteilung bei den nichtreziproken Translokationen: Kontrolle 1 – 6,3%, Kontrolle 2 – 37,5% und Kontrolle 3 – 18,2%. Auch die Häufigkeit von dicentrischen Chromosomen unterschied sich bei den AT-Heterozygoten in dieser Bestrahlungsstufe erheblich mit Werten von 52% (AT-Het 1) und 29,2% (AT-Het 2), um einige Beispiele zu nennen.

4.2.4 Maximale Anzahl von Bruchereignissen pro Metaphase

Zusätzlich wurde pro Fall und Bestrahlungsstufe die absolute Anzahl der Brüche pro einzelner analysierter Metaphase betrachtet. Keine Zelle der Kontrollen und Heterozygoten aus den unbestrahlten Proben enthielt mehr als zwei Brüche. Bei dem AT-Patienten fanden sich bis zu drei Brüche pro Metaphase in der 0Gy-Stufe. Bis zu sieben DSB konnte bei den Kontrollen und AT-Heterozygoten nach 0,7Gy-Bestrahlung registriert werden, während bei dem AT-Homozygoten 4,4% der Zellen acht oder mehr Chromosomenbrüche enthielten. Die grösste Anzahl an DSB lag in

diesem Fall bei dreizehn. Nach Applikation von 2,0Gy konnten in den Zellen der Kontrollen bis zu elf Brüche nachgewiesen werden; bei den AT-Heterozygoten maximal dreizehn.

Deutlich konnte der AT-Patient abgegrenzt werden, dessen Zellen in 7,2% dreizehn oder mehr DSB beinhalten. Die Maximalzahl von Brüchen in einer einzelnen MPP lag in diesem Fall bei sechzehn. Eine vollständige Auflistung der relativen Häufigkeit von Chromosomenbrüchen pro Metaphase zeigt nachfolgende Tabelle.

Tabelle 15: Prozentualer Anteil von Zellen mit n Brüchen pro MPP (AT-Het 1: AT-Heterozygoter 1; AT-Het 2: AT-Heterozygoter 2; AT-Hom: AT-Homozygoter). n= absolute Anzahl der Chromosomenbrüche

Patient + Strahlendosis	n = 0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Kontrolle 1 0Gy	100																
Kontrolle 1 0,7Gy	90,3	1,9	5,8	1	1												
Kontrolle 1 2,0Gy	56,4	5,8	23,1	6,4	5,1	1,9	1,3										
Kontrolle 2 0Gy	100																
Kontrolle 2 0,7Gy	87,6	4,1	6,6	0,8	0,8												
Kontrolle 2 2,0Gy	59,1	6,8	20,5	2,3	5,3	0,8	3	1,5	0,8								
Kontrolle 3 0Gy	94,1	2	3,9														
Kontrolle 3 0,7Gy	82,2	4,7	8,4	1,9	0,9	0,9		0,9									
Kontrolle 3 2,0Gy	42,3	6,7	26,9	8,7	5,8	1,9	2,9	1	1,9		1	1					
AT-Het 1 0Gy	95,5	3	1,5														
AT-Het 1 0,7Gy	55,1	6,5	21,5	4,7	6,5	0,9	2,8	1,9									
AT-Het 1 2,0Gy	55,3	7,8	17	7,1	7,1	2,1	2,8							0,7			
AT-Het 2 0Gy	97,5	1,9	0,6														
AT-Het 2 0,7Gy	77,9	6,4	9,3	3,6	2,1	0,7											
AT-Het 2 2,0Gy	35	6	18	5	9	9	4	2	1	7	2	1	1				
AT-Hom 0Gy	92,7	3,2	3,2	0,8													
AT-Hom 0,7Gy	35,3	17,2	15,5	12,1	6	2,6	3,4	3,4	2,6	0,9				0,9			
AT-Hom 1,4Gy	8	1,8	8	8,9	9,8	2,7	8,9	9,8	8,9	8	6,3	4,5	7,1	2,7	2,7		1,8

4.2.5 Charakterisierung der aufgetretenen CCR

Als weiterer Parameter zur Unterscheidung der einzelnen Individuen fungierte die Rate an Bruchereignissen, die in die Formierung von CCR involviert waren. Deutlich konnte der AT-Homozygote anhand der gefundenen Häufigkeit von komplexen

Chromosomenaberrationen von den anderen Probanden abgrenzt werden. Diese lag mit 0,12 CCR/M nach 0,7Gy und 0,83 CCR/M nach 1,4Gy erheblich über der von AT-Heterozygoten und Kontrollen.

Nach 0,7Gy-Bestrahlung ergaben sich für die Kontrollen Werte von 0,02 sowie 0,01 und 0,04 CCR/M. Diese Analyse ermöglichte unter Berücksichtigung dieser Werte keine eindeutige Unterscheidung der Kontrollen von den beiden Heterozygoten, da der Wert für den AT-Heterozygoten 2 (AT-Het 2) mit 0,04 CCR/M genauso hoch war wie der für Kontrolle 3. Eine im Vergleich zu den Kontrollen grössere Rate an CCR/M wies nur der AT-Heterozygote 1 (AT-Het 1) mit 0,07 auf.

Dasselbe Problem fand sich auch nach Applikation von 2,0Gy. Im Vergleich mit den Ergebnissen von 0,03 sowie 0,08 und 0,12 CCR/M für die Kontrollen konnte nur AT-Het 2 mit einer Rate von 0,27 CCR/M abgegrenzt werden. Der Wert für AT-Het 1 lag mit 0,1 CCR/M niedriger als der für die Kontrolle 3 mit 0,12 CCR/M, womit auch in dieser Bestrahlungsstufe keine exakte Differenzierung von AT-Heterozygoten und Kontrollen möglich war. Zur Veranschaulichung dieser Problematik dienen die nachfolgenden Graphiken.

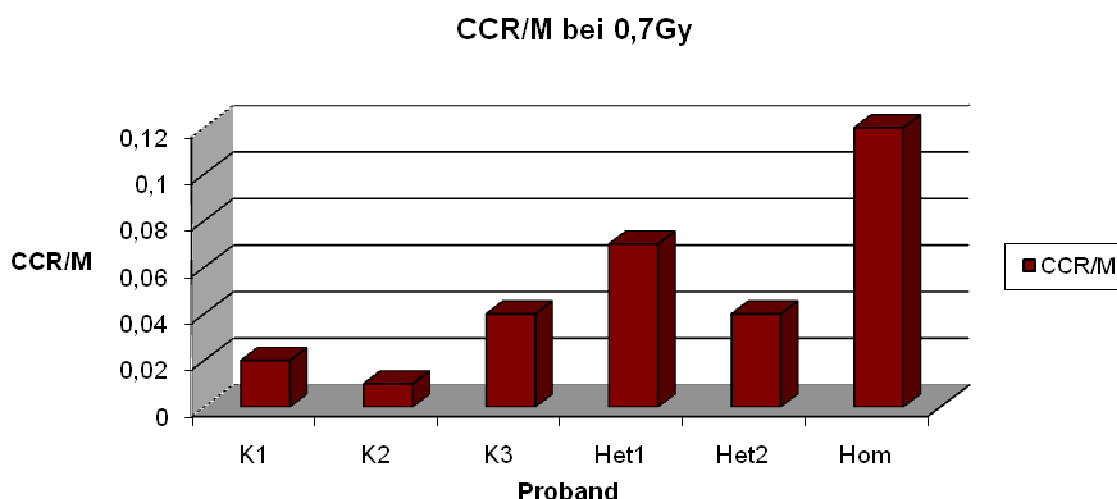


Abbildung 10: Darstellung der durchschnittlichen Rate an komplexen chromosomalen Rearrangements pro Mitose (CCR/M) nach Bestrahlung mit 0,7Gy bei Kontrolle 1 (K1); Kontrolle 2 (K2); Kontrolle 3 (K3); AT-Heterozygotem 1 (Het 1); AT-Heterozygotem 2 (Het 2) und AT-Homozygotem (Hom)

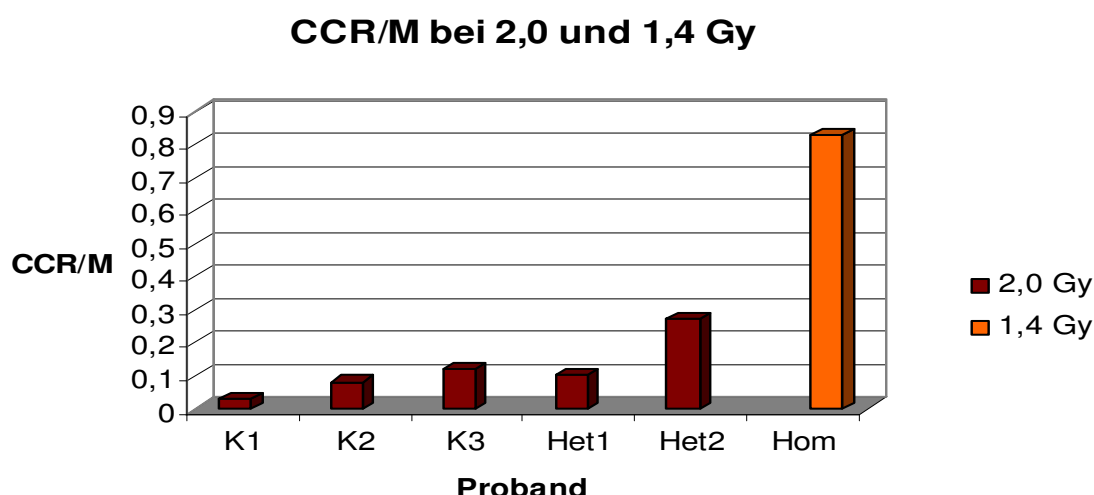


Abbildung 11: Darstellung der durchschnittlichen Rate an komplexen chromosomalen Rearrangements pro Mitose (CCR/M) nach Bestrahlung mit 2Gy (bzw. 1,4Gy) bei Kontrolle 1 (K1); Kontrolle 2 (K2); Kontrolle 3 (K3); AT-Heterozygotem 1 (Het 1); AT-Heterozygotem 2 (Het 2) und AT-Homozygotem (Hom)

Die Prozentzahl von Chromosomenbrüchen, die in die Formation komplexer chromosomaler Umbauten involviert waren, unterschied sich im Hinblick auf die drei Bestrahlungsstufen. In keiner der unbestrahlten Proben von Kontrollen oder AT-Mutationsträgern fand sich ein komplexes Rearrangement. Relativ uniform präsentierten sich die für die 0,7Gy-Stufe erhobenen Daten: in den Zellen der Kontrollen waren 25,1% der DSB an CCR beteiligt, ebenfalls 25,1% bei den AT-Heterozygoten und 23,8% bei dem AT-Homozygoten. Eine Steigerung zeichnete sich in der 2,0Gy-Bestrahlungsstufe ab. Hier waren 19,3% der Brüche in den Kontrollen, 32,4% in den Heterozygoten und 52,1% der Chromosomenbrüche bei dem AT-Homozygoten in die Bildung von CCR involviert, wobei die Zellen des Homozygoten lediglich mit 1,4Gy bestrahlt wurden. Eine Unterscheidung der einzelnen Gruppen war demnach nach Dosissteigerung auf 2,0Gy möglich, wenn nicht jeder einzelne Proband getrennt, sondern die Ergebnisse in drei Gruppen, d.h. Kontrollen, Heterozygote und Homozygoter zusammenfasst betrachtet wurden. Eine klare Abgrenzung des AT-Homozygoten von Heterozygoten und Kontrollen gelang anhand des prozentualen Anteils der in die Bildung von CCR involvierten Chromosomen lediglich nach einer Strahlungsdosis von 2Gy, nicht jedoch bei 0,7Gy.

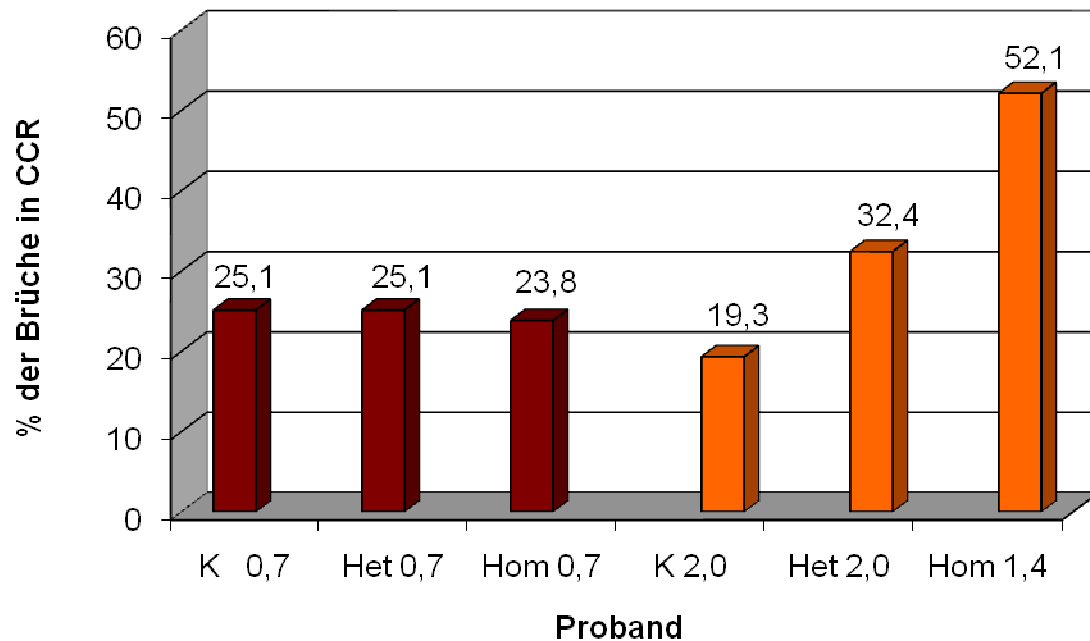


Abbildung 12: Prozentualer Anteil der insgesamt aufgetretenen Chromosomenbrüche je Proband und Bestrahlungsstufe, der in die Formation von komplexen chromosomalen Rearrangements (CCR) involviert ist, nach 0,7Gy-Bestrahlung für Kontrollen (K 0,7); AT-Heterozygote (Het 0,7); AT-Homozygoten (Hom 0,7) sowie nach 2,0Gy-Bestrahlung für Kontrollen (K 2,0), AT-Heterozygote (Het 2,0) und für den AT-Homozygoten nach 1,4Gy-Bestrahlung (Hom 1,4)

Die detaillierte Analyse der Rearrangements ergab, dass der Grad der Komplexität der chromosomalen Umbauten mit zunehmender Strahlendosis stark anstieg und wie erwartet bei dem AT-Patienten in der 1,4Gy-Bestrahlungsstufe die meisten und komplexesten Chromosomenaberrationen gefunden wurden.

4.3 Unterschiede in der Bruchrate pro Mitose (B/M) bei drei und 24 ausgewerteten Chromosomen

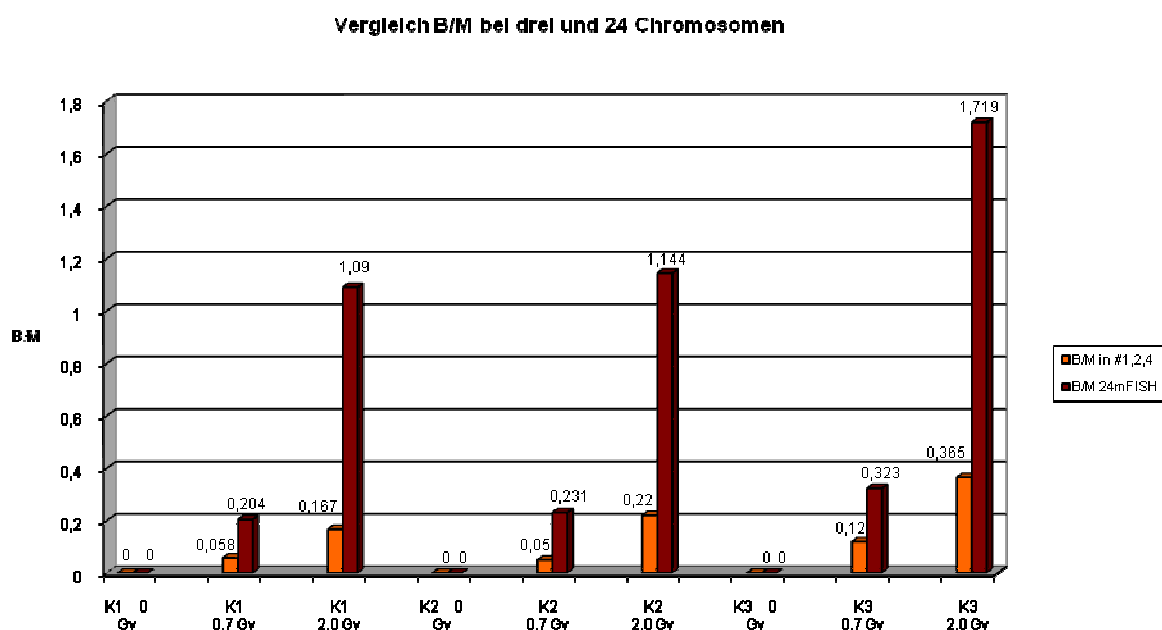


Abbildung 13: Durchschnittliche Bruchraten pro Mitose für die Kontrollen (K1, K2, K3) in den Bestrahlungsstufen 0Gy, 0,7Gy und 2,0Gy nach Auswertung von Chromosom 1, 2 und 4 sowie nach Auswertung aller 24 Chromosomen (M-FISH). Berechnete Werte nach Einbeziehen aller je Proband und Bestrahlungsstufe verfügbaren MPP

Um einen Vergleich der beiden Methoden 3-Farb-FISH und M-FISH zu simulieren, wurde die Bruchrate pro Mitose von allen 24 Chromosomen der nach Auswertung der Chromosomen 1, 2 und 4 gegenübergestellt. In den nachfolgenden Abbildungen wurden für die jeweiligen Probanden und Bestrahlungsstufen die durchschnittliche Bruchrate pro Mitose (B/M) nach M-FISH in allen ausgewerteten MPP veranschaulicht, während in den benachbarten Säulen die B/M, die auf die Chromosomen 1, 2 und 4 entfielen, dargestellt wurden. Wie erwartet lagen die resultierenden Bruchwerte bei Auswertung aller 24 markierten Chromosomen höher als bei Betrachtung von nur drei ausgewählten Chromosomen.

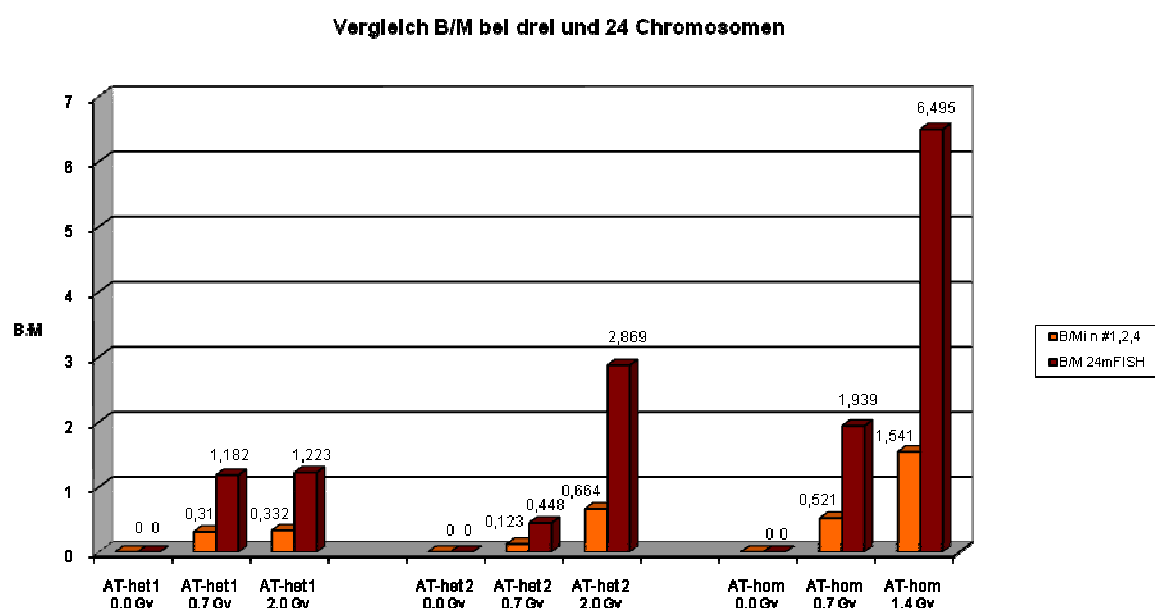


Abbildung 14: Durchschnittliche Bruchraten pro Mitose für die beiden AT-Heterozygoten (AT-het1; AT-het2) und den AT-Homozygoten (AT-hom) in den Bestrahlungsstufen 0Gy, 0,7Gy und 2,0Gy (1,4Gy bei AT-hom) nach Auswertung von Chromosom 1, 2 und 4 sowie nach Auswertung aller 24 Chromosomen (M-FISH). Berechnete Werte nach Einbeziehen aller je Proband und Bestrahlungsstufe verfügbaren MPP

Für Kontrolle 1 betrug die Bruchrate pro Mitose 0,058 nach Auswertung von Chromosom 1, 2 und 4, während bei Einbeziehung aller 24 Chromosomen 0,204 B/M nach 0,7Gy-Bestrahlung auftraten. Die M-FISH ergab somit eine 3,5fach höhere Bruchrate. Bei Kontrolle 2 waren es 0,05 B/M bei drei ausgewerteten Chromosomen, 0,231 B/M wurden durch M-FISH in der 0,7Gy-Stufe erfasst, d.h. 4,6fach so viele. Kontrolle 3 wies 0,323 B/M in allen 24 Chromosomen auf, 2,7 mal so viele wie in den Chromosomen 1, 2 und 4 mit 0,12 B/M.

Analog dazu betrugen die Bruchraten in der 0,7Gy-Stufe für AT-Het 1 0,31 bzw. 1,182 B/M, für AT-Het 2 0,123 und 0,448 sowie für den AT-Homozygoten 0,521 bzw. 1,939 B/M. Der jeweils zweitgenannte Wert, der nach Auswertung aller 24 Chromosomen berechnet wurde, war 3,8, 3,6 sowie 3,7 mal so hoch wie der erstgenannte Wert für die Brüche pro Mitose in den Chromosomen 1, 2 und 4.

In der 2,0Gy-Bestrahlungsstufe ergaben sich für die Kontrollen eins bis drei Bruchraten von 0,167 bzw. 1,09, 0,22 bzw. 1,144 sowie 0,365 und 1,719 B/M, wobei der zweitgenannte Wert nach Einbeziehung aller 24 Chromosomen um den Faktor 6,5, 5,2 bzw. 4,7 höher war als der erstgenannte Wert für die drei ausgewählten Chromo-

somen eins, zwei und vier. Bei AT-Het 1 betrugen die Bruchraten pro Mitose nach 2,0Gy-Applikation 0,332 für Chromosom 1, 2 und 4 sowie 1,223 nach M-FISH, während für AT-Het 2 Werte von 0,664 und 2,869 berechnet wurden. Obwohl für beide AT-Heterozygote sehr unterschiedliche Werte vorlagen, betrug der Faktor, um den die Bruchrate pro Mitose nach Auswertung aller 24 Chromosomen höher war, 3,7 für AT-Het 1 bzw. 4,3 für AT-Het 2. Wie bei den Kontrollen waren diese Faktoren sehr ähnlich, d.h. dass eine Tendenz für die Bruchrate bereits anhand der Zahlen nach Auswertung von nur drei ausgewählten Chromosomen ablesbar war.

Dies zeigte sich auch an den Werten des AT-Homozygoten, wo 6,495 B/M nach 1,4Gy-Bestrahlung vorlagen, 4,2fach so viele wie nach Auswertung der Chromosomen 1, 2 und 4 mit 1,541 B/M auftraten. Der prozentuale Anteil, den die Brüche auf den Chromosomen 1, 2 und 4 von der Gesamtbruchrate pro Mitose nach M-FISH-Auswertung je Proband und Bestrahlungsstufe bildeten, wurde berechnet. Geht man davon aus, dass die Chromosomen 1, 2 und 4 etwa 22% der DNA des Genoms umfassen, entsprach abgesehen von zwei Werten (Kontrolle 1 2,0Gy: 15,3% und Kontrolle 3 0,7Gy: 37,2%) der prozentuale Anteil der auf diese drei Chromosomen entfallenden Brüche etwa dem vom DNA-Gehalt abhängigen erwarteten Anteil an Brüchen, d.h. bewegte sich zwischen 19,2% und 28,4%.

Vergleich B/M bei drei und 24 Chromosomen

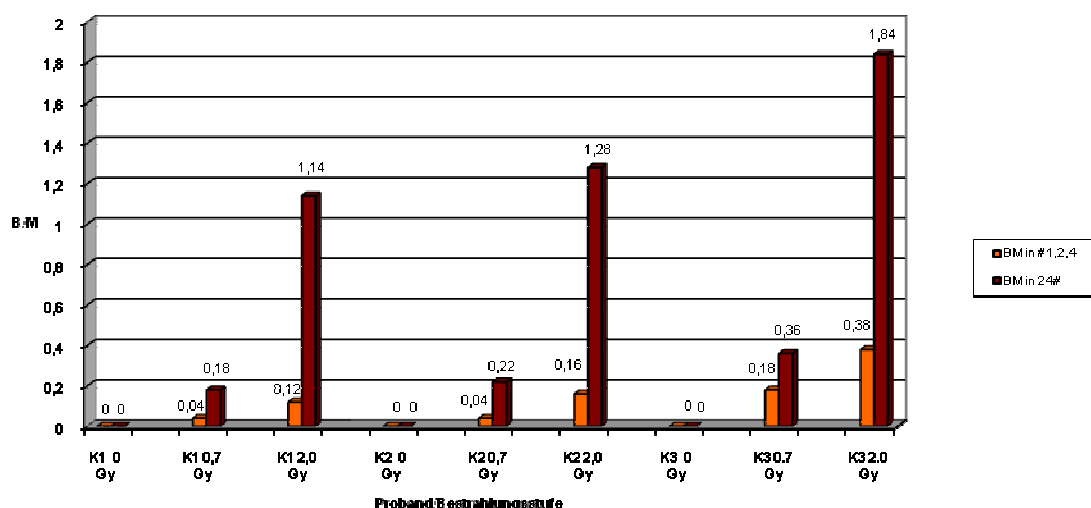


Abbildung 15: Durchschnittliche Bruchraten pro Mitose für die Kontrollen (K1, K2, K3) in den Bestrahlungsstufen 0Gy, 0,7Gy und 2,0Gy nach Auswertung von Chromosom 1, 2 und 4 sowie nach Auswertung aller 24 Chromosomen (M-FISH). Berechnete Werte nach Einbeziehen der ersten 50 je Proband und Bestrahlungsstufe verfügbaren MPP.

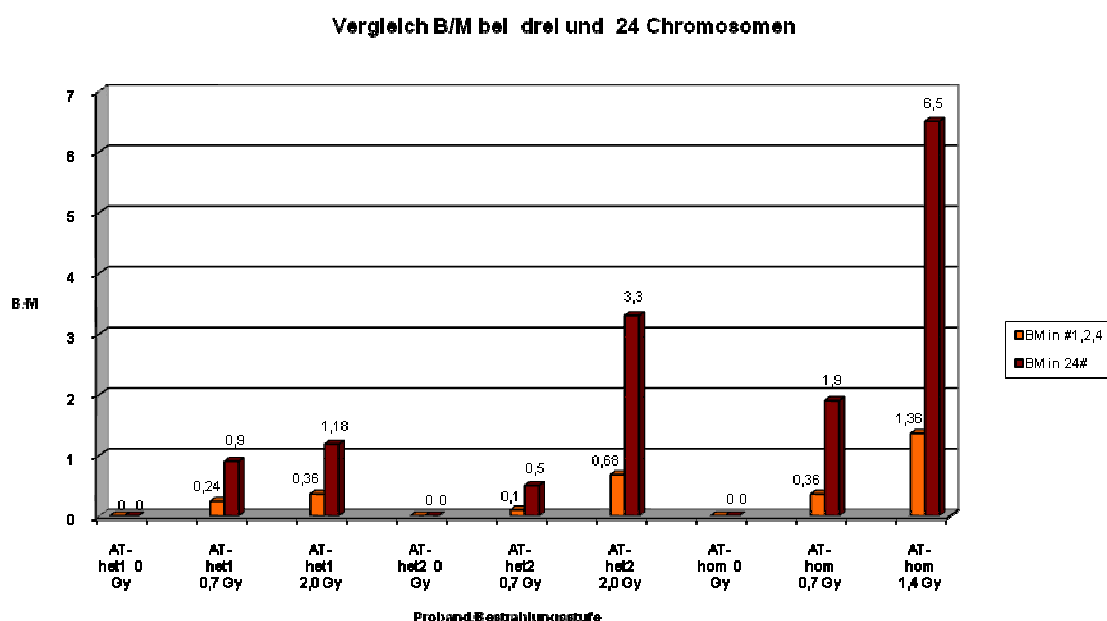


Abbildung 16: Durchschnittliche Bruchraten pro Mitose für die beiden AT-Heterozygoten (AT-het1; AT-het2) und den AT-Homozygoten (AT-hom) in den Bestrahlungsstufen 0Gy, 0,7Gy und 2,0Gy (1,4Gy bei AT-hom) nach Auswertung von Chromosom 1, 2 und 4 sowie nach Auswertung aller 24 Chromosomen (M-FISH). Berechnete Werte nach Einbeziehen der ersten 50 je Proband und Bestrahlungsstufe verfügbaren MPP.

Im Anschluss wurde durch Reduktion der Anzahl der ausgewerteten Metaphasen auf die jeweils ersten 50 je Proband und Bestrahlungsstufe geprüft, ob die Unterscheidung der Probanden anhand der Bruchrate pro Mitose bereits nach Auswertung geringerer Metaphasezahlen umsetzbar war, um so die Möglichkeit der Reduzierung des Arbeitsaufwandes zu prüfen.

Graphisch wurden die Resultate in Abb.15 und 16 dargestellt.

So resultierten für Kontrolle 1 und 2 jeweils 0,04 B/M, für Kontrolle 3 0,18 B/M in der 0,7Gy-Stufe für die Chromosomen eins, zwei und vier nach Auswertung der ersten 50 MPP je Proband, während sich nach Auswertung aller verfügbaren MPP für K1 0,058 B/M, für K2 0,05 B/M und für K3 0,12 B/M ergaben.

Nach M-FISH und 0,7Gy-Applikation wurden für die ersten 50 Metaphasen 0,18 B/M für K1, 0,22 B/M für K2 und 0,36 B/M für K3 registriert, im Vergleich dazu 0,204 B/M für K1, 0,231 B/M für K2 und 0,323 B/M für K3 nach Einbeziehen aller verfügbaren MPP.

In der 2,0Gy-Stufe fanden sich für die jeweils ersten 50 MPP bei K1 0,12 bzw. 1,14 B/M, für K2 0,16 und 1,28 B/M sowie 0,38 und 1,84 B/M für K3, wobei der erstgenannte Wert für die durchschnittliche Bruchrate der Chromosomen eins, zwei und

vier, der zweite für die Brüche nach M-FISH ermittelt wurde. Verglichen damit betrugen die Werte für alle Metaphasen nach 2,0Gy-Bestrahlung für Chromosom eins, zwei und vier zusammen für K1 0,167 B/M, 0,22 B/M für K2 und 0,365 B/M für K3, während nach M-FISH als Bruchraten für K1 1,09, für K2 1,144 und für K3 1,719 errechnet wurden.

Für AT-Het 1 betrugen die Werte für die ersten 50 MPP und drei bzw. 24 ausgewertete Chromosomen 0,24 und 0,9, für AT-Het 2 0,1 und 0,5 in der 0,7Gy-Bestrahlungsstufe. Demgegenüber lagen die Bruchraten nach Einbeziehen aller verfügbaren MPP je Proband nach 0,7Gy-Applikation für AT-Het 1 bei 0,31 und 1,182 B/M sowie für AT-Het 2 bei 0,123 und 0,448 B/M, wobei der erstgenannte Wert wieder für drei, der andere für 24 ausgewertete Chromosomen steht.

Ausserdem ergaben sich für AT-Het 1 Bruchraten von 0,36 B/M bzw. 1,18 B/M und für AT-Het 2 0,68 sowie 3,3 B/M in der 2,0Gy-Stufe für jeweils drei und 24 ausgewertete Chromosomen nach den ersten 50 Metaphasen. Die Werte nach Auswertung aller MP in dieser Bestrahlungsstufe betrugen analog für AT-Het 1 0,332 und 1,223 B/M sowie für AT-Het 2 0,664 und 2,869 B/M.

Nach Verwendung der ersten 50 MPP wies der AT-Homozygote 0,36 B/M bei Auswertung der Chromosomen eins, zwei und vier sowie 1,9 B/M für alle 24 Chromosomen nach 0,7Gy-Applikation auf. Demgegenüber lagen die Bruchraten nach Auswertung aller MPP in der 0,7Gy-Stufe für Chromosom eins, zwei und vier bei 0,521 B/M für den AT-Patienten, die zugehörigen M-FISH-Daten für alle MPP betrugen 1,939 B/M.

Die höchste Bruchrate für die ersten 50 MPP fand sich erwartungsgemäß beim AT-Homozygoten nach 1,4Gy-Bestrahlung, wobei die Rate mit 6,5 B/M nach M-FISH 4,8mal höher war als die für Chromosom eins, zwei und vier zusammen mit 1,36 B/M. Zum Vergleich dazu lagen die Werte in dieser Bestrahlungsstufe nach Auswertung aller Metaphasen bei 1,541 B/M bzw. 6,495 B/M nach M-FISH.

Anhand der ermittelten Werte wurde deutlich, dass bereits eine Auswertung der ersten 50 MPP je Proband bezüglich der durchschnittlichen Bruchrate pro Mitose ähnliche Werte wie die Einbeziehung aller verfügbaren Metaphasen in die Auswertung ergab. Ausserdem ergaben sich ähnliche Faktoren, um die sich die Bruchrate nach drei einbezogenen Chromosomen von der nach 24 ausgewerteten Chromosomen unterschied.

4.4 Beteiligung der einzelnen Chromosomen an Chromosomenbrüchen

Um darzustellen, ob auf bestimmten Chromosomen überproportional viele Chromosomenbrüche vorhanden sind, wurde der prozentuale Anteil der Chromosomenbrüche für jedes Chromosom an den Gesamtbrüchen für jede Bestrahlungsstufe berechnet, und zwar nach der Formel:

$$(\text{Median der Brüche im jeweiligen Chromosom} / \text{Median der Brüche im gesamten Genom}) \times 100$$

Der Median der Brüche im jeweiligen Chromosomen wurde hierbei aus den absoluten Anzahlen der Chromosomenbrüche der einzelnen Probanden, die in den Tabellen 11 bis 13 aufgelistet sind, berechnet. Das Ergebnis ist für jede Gruppe und Bestrahlungsintensität getrennt dargestellt (Tabelle 14). Diese Berechnung berücksichtigt noch nicht den unterschiedlichen DNA-Gehalt der einzelnen Chromosomen. Da die menschlichen Chromosomen unterschiedlich lang sind und deshalb einen dementsprechend unterschiedlichen DNA-Gehalt aufweisen, muss dies bei der Interpretation der absoluten Bruchwerte berücksichtigt werden. Es wurde jeweils der relative DNA-Gehalt jedes Chromosoms, gemessen an den ISCN-Ideogrammen nach Stephens et al. (1990), herangezogen. Dieser repräsentiert die Länge des jeweiligen Chromosoms als Prozentsatz der totalen Länge des Gesamtgenoms. Die Bruchhäufigkeit der einzelnen Chromosomen wurde in Relation zu ihrem DNA-Gehalt in Prozent graphisch dargestellt, wobei jeder Punkt der Graphik einem spezifischen Chromosom entspricht. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 17 veranschaulicht.

Tabelle 16:

Prozentualer Anteil der Chromosomenbrüche bei „Bestrahlungsintensität“ 0Gy für das jeweilige Chromosom. Vergleichend ist der relative DNA-Gehalt bzw. die prozentuale Chromosomenlänge = Stephens-Faktor (nach Stephens et al., 1990) dargestellt. Übersteigt der Wert für den prozentualen Anteil der Chromosomenbrüche den Stephens-Faktor, so ist das Chromosom überproportional häufig von Bruchereignissen betroffen, und zwar umso stärker, je weiter die beiden Werte voneinander abweichen.

Chromosom	Stephens-Faktor	Kontrollen	Heterozygote	Homozygoter
1	8,3	0,0	15,4	20,0
2	7,9	0,0	0,0	20,0
3	6,4	0,0	0,0	0,0
4	6,1	0,0	0,0	0,0
5	5,8	0,0	15,4	0,0
6	5,5	0,0	15,4	0,0
7	5,1	0,0	0,0	0,0
8	4,5	0,0	23,1	0,0
9	4,4	0,0	0,0	0,0
10	4,4	0,0	0,0	6,7
11	4,4	0,0	0,0	0,0
12	4,1	0,0	7,7	6,7
13	3,6	0,0	0,0	0,0
14	3,5	0,0	0,0	6,7
15	3,3	0,0	0,0	6,7
16	2,8	0,0	7,7	6,7
17	2,7	0,0	7,7	6,7
18	2,5	0,0	0,0	0,0
19	2,3	0,0	0,0	0,0
20	2,1	0,0	0,0	13,3
21	1,8	0,0	0,0	0,0
22	1,9	0,0	0,0	0,0
X	4,7	0,0	7,7	6,7
Y	2,0	0,0	0,0	0,0

Tabelle 17:

Prozentualer Anteil der Chromosomenbrüche bei Bestrahlungsintensität 0,7Gy für das jeweilige Chromosom. Vergleichend ist der relative DNA-Gehalt (nach Stephens et al. 1990) dargestellt. Übersteigt der Wert für den prozentualen Anteil der Chromosomenbrüche den Stephens-Faktor, so ist das Chromosom überproportional häufig von Bruchereignissen betroffen.

Chromosom	Stephens-Faktor	Kontrollen	Heterozygote	Homozygoter
1	8,3	14,3	7,0	10,0
2	7,9	4,8	11,5	11,3
3	6,4	4,8	4,5	6,3
4	6,1	9,5	7,5	6,3
5	5,8	0,0	5,0	4,6
6	5,5	14,3	6,5	5,4
7	5,1	0,0	10,0	6,3
8	4,5	4,8	4,0	5,9
9	4,4	14,3	5,5	5,4
10	4,4	4,8	3,0	5,0
11	4,4	0,0	4,0	3,8
12	4,1	0,0	5,0	4,6
13	3,6	0,0	5,0	1,7
14	3,5	0,0	2,5	2,5
15	3,3	0,0	4,5	4,2
16	2,8	9,5	4,0	2,9
17	2,7	9,5	1,0	1,3
18	2,5	0,0	2,5	0,8
19	2,3	9,5	1,0	2,5
20	2,1	0,0	0,5	1,7
21	1,8	0,0	0,5	0,4
22	1,9	0,0	1,5	1,3
X	4,7	0,0	3,0	5,9
Y	2,0	0,0	0,5	0,0

Tabelle 18:

Prozentualer Anteil der Chromosomenbrüche bei Bestrahlungsintensität 2,0Gy bzw 1,4Gy bei dem AT-Homozygoten für das jeweilige Chromosom. Vergleichend ist der relative DNA-Gehalt (nach Stevens et al. 1990) dargestellt. Übersteigt der Wert für den prozentualen Anteil der Chromosomenbrüche den Stephens-Faktor, so ist das Chromosom überproportional häufig von Bruchereignissen betroffen.

Chromosom	Stephens-Faktor	Kontrollen	Heterozygote	Homozygoter
1	8,3	5,7	11,1	10,3
2	7,9	7,6	7,4	7,9
3	6,4	5,7	8,7	6,3
4	6,1	6,4	6,1	5,5
5	5,8	6,4	3,3	5,6
6	5,5	7,0	4,6	4,3
7	5,1	5,7	3,3	5,0
8	4,5	4,5	5,0	6,5
9	4,4	6,4	3,7	3,9
10	4,4	5,7	3,7	4,8
11	4,4	5,7	4,6	7,2
12	4,1	5,1	5,9	5,6
13	3,6	3,2	3,3	3,0
14	3,5	4,5	3,5	3,7
15	3,3	5,1	4,8	4,1
16	2,8	1,9	5,0	3,0
17	2,7	1,9	3,5	3,0
18	2,5	3,8	2,0	1,7
19	2,3	0,6	2,0	2,5
20	2,1	1,9	0,9	1,4
21	1,8	1,3	1,5	0,8
22	1,9	1,3	1,1	0,8
X	4,7	1,9	4,8	1,8
Y	2,0	0,6	0,2	1,2

Anhand der Abbildung 17 wird deutlich, dass sich erwartungsgemäß eine Zunahme der Chromosomenbrüche bei steigender Strahlendosis bei Kontrollen, AT-Heterozygoten und dem AT-Homozygoten zeigte. Erkennbar ist auch eine Zunahme an Bruchereignissen mit zunehmendem prozentualen DNA-Gehalt der Chromosomen.

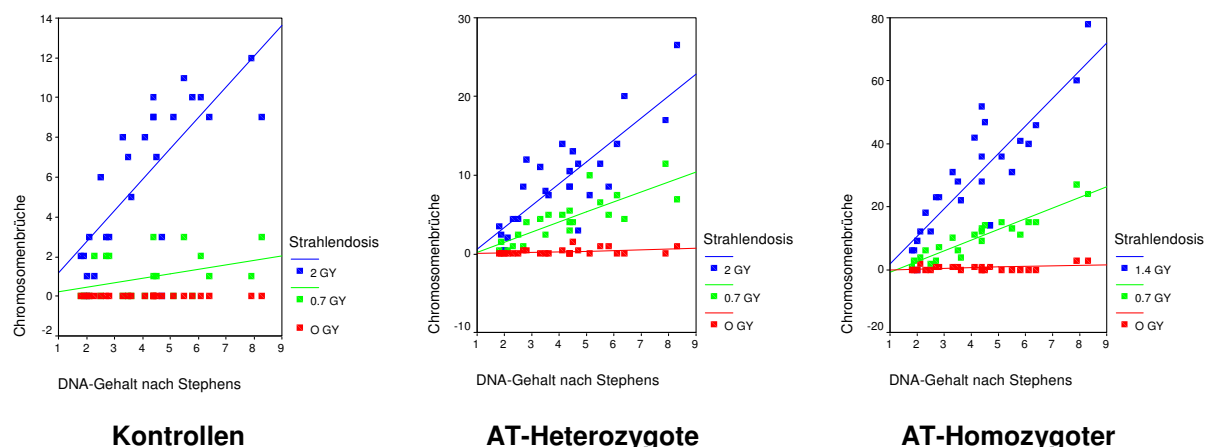


Abbildung 16: Darstellung der Anzahl der Chromosomenbrüche bei den Kontrollen, AT-Heterozygoten und AT-Homozygoten, in Relation zum prozentualen DNA-Gehalt des jeweiligen Chromosoms am Gesamtgenom für die drei Bestrahlungsintensitäten: Es ist erkennbar, dass die Zahl der Chromosomenbrüche bei höherer Bestrahlungsintensität und zunehmendem DNA-Gehalt des Chromosoms zunimmt. Eine größere Entfernung von der Anpassungslinie entspricht hierbei einer größeren Abweichung von der statistischen Bruchwahrscheinlichkeit. Es wird deutlich, dass sich keine offensichtlichen Ausreißer zeigen.

4.5 Spezifische Translokationen

In der Literatur wurde wiederholt das spontane Auftreten von Translokationen von Chromosom 7 mit Chromosom 14 bei AT-Patienten beschrieben (Taylor et al., 1981; Kojis et al., 1991). Die vorliegende Analyse zeigte in der unbestrahlten Probe des AT-Homozygoten kein Auftreten der Translokation $t(7;14)$. Gleiches traf auf die Probe nach 0,7Gy-Bestrahlung zu. Die Auswertung von 112 Metaphasen nach 1,4Gy-Bestrahlung ergab eine reziproke Translokation $t_R(7;14)$ und ein dicentrisches Chromosom $dic(7;14)$ mit acentrischem Fragment. Dabei entsprachen die Aberrationen nicht den AT-typischen Bruchpunkten, die in der Literatur genannt werden.

4.6 Persistierende Translokation

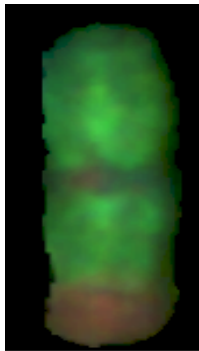


Abbildung 17: Klonale Translokation $t(1^*;3)$

In den Zellen des AT-Patienten konnte nach einer Bestrahlung mit 1,4Gy eine klonale Aberration identifiziert werden. Das Auftreten stabiler Aberrationen nach Bestrahlung wurde bereits in der Literatur beschrieben (Matsumoto et al., 1998). Dabei handelte es sich um eine Translokation von Material von Chromosom eins und drei (mit dem Zentromer des Chromosoms eins, entsprechend der hier angewendeten Formel beschrieben als $t(1^*;3)$). Diese Translokation konnte in 91% der Metaphaseplatten nachgewiesen werden und war auch wiederholt an chromosomalen Umbauten beteiligt. Da es sich mit grosser Wahrscheinlichkeit um einen klonalen Effekt in der angelegten Zelllinienkultur handelt, wurden die registrierten Chromosomenaberrationen so bewertet, als ob es sich um ein reguläres Chromosom eins handeln würde.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die M-FISH-Methode zur Analyse von *in vitro* strahleninduzierten chromosomalen Veränderungen angewendet. Mit dieser Methode kann das gesamte Genom gleichzeitig auf zytogenetischer Ebene hinsichtlich chromosomaler Aberrationen untersucht werden. Ziel der Arbeit war, die Möglichkeiten und Anwendbarkeit dieser Methode zu testen, insbesondere, ob und inwiefern mit dieser Methode anhand bestimmter Parameter erhöhte Strahlensensitivität erfasst werden kann und wie zuverlässig AT-Heterozygote von einem AT-Homozygoten und von Kontrollen unterschieden werden können. Ferner sollte die Bedeutung einzelner Typen von Chromosomenaberrationen bei *in vitro* strahleninduzierten Chromosomenveränderungen genauer untersucht werden. Hierbei war von besonderem Interesse, ob es Hinweise gibt, dass einzelne Chromosomen nach Bestrahlung häufiger in Bruchereignisse involviert sind als andere.

Der Zusammenhang von zellulärer Strahlensensitivität *in vitro*, erfasst in Form von aufgetretenen Chromosomenschäden, und der klinischen Strahlenreaktion von Patienten wurde in den letzten Jahren in zahlreichen Untersuchungen an Fibroblasten und Lymphozyten analysiert. Ziel dieser Studien war, eine Vorhersage der klinischen Reaktion von Radiotherapiepatienten zu ermöglichen. Abgesehen von den seltenen Fällen genetisch determinierter Hypersensitivität gegenüber ionisierender Strahlung, wie z.B. bei der AT, ist jedoch bisher nicht ausreichend beschrieben, inwieweit ein genereller Zusammenhang zwischen zellulärer Strahlenempfindlichkeit und klinischer Strahlenreaktion besteht (Bentzen, 1997; Mackay and Hendry., 1999, Borgmann et al., 2002, Oppitz et al., 2002, Hoeller et al., 2003).

Es finden sich einige Studien, die sich mit der Erforschung der individuellen Strahlensensitivität durch Untersuchung von Chromosomen mit Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung beschäftigt haben. In einigen Arbeiten zu dieser Thematik von Neubauer et al. (1996, 1997, 2002), Dunst et al. (1995) und Gebhart et al. (1996) konnte bereits die 3-Farb-FISH erfolgreich zur Charakterisierung der individuellen Radiosensitivität von *in vitro* Strahlenschäden bei chromosomalen Instabilitätssyndromen und Krebspatienten eingesetzt werden.

Da letztlich ungeklärt ist, ob strahleninduzierte Aberrationen im Genom zufällig verteilt sind oder bestimmte Chromosomen häufiger involviert sind als andere (Cigarran et al., 1998; Knehr et al., 1996; Braselmann et al., 2003), wurde die vorliegende Untersuchung nicht nur an drei, sondern an allen 24 Chromosomen des menschlichen Chromosomensatzes vorgenommen. Der AT-Patient wurde dabei als sichere „Positivkontrolle“ für erhöhte Strahlensensitivität eingesetzt. Umfangreiche Daten zur Untersuchung von AT-Heterozygoten und AT-Homozygoten bezüglich zellulärer Strahlensensitivität wurden von Neubauer et al. (2002) im Rahmen ihrer Studie vorgelegt, wobei sich die 3-Farb-FISH als geeignete Methode zur Identifikation von AT-Heterozygoten und AT-Patienten nach *in vitro* Bestrahlung von Lymphocyten und Zelllinien erwies.

Die chromosomale Strahlenempfindlichkeit von AT-Heterozygoten und AT-Homozygoten war zuvor überwiegend durch G₂-Phase-Bestrahlung und anschließende Analyse mittels konventioneller Zytogenetik untersucht worden (Shiloh et al., 1989; Scott et al., 1996 und Tchirkov et al., 1997). Dabei konnten jeweils homozygote Genträger von Kontrollen abgegrenzt werden, während die Identifikation von AT-Heterozygoten nicht gelang.

Im Vergleich zu den meisten vorangegangenen Studien wurden in dieser alle 24 Chromosomen einer Metaphase mit einer einzigen Hybridisierung erfasst.

Im Anschluß wurden die jeweiligen untersuchten Parameter zur Identifikation von *in vitro* Strahlenschäden im Einzelnen ausgewertet.

5.1 Mögliche Parameter zur Detektion *in vitro* strahlenbedingter Veränderungen

5.1.1 Anteil aberranter Zellen

Im Hinblick auf den prozentualen Anteil aberranter MPP konnte der AT-Homozygote mit 64,7% nach 0,7Gy-Bestrahlung und 92,0% nach 1,4Gy-Applikation klar von Heterozygoten und Kontrollen abgegrenzt werden. Die Kontrollen wiesen mit 13,3% und 47,4% der Zellen den geringsten Teil an Aberrationen nach 0,7Gy bzw. 2,0Gy-Bestrahlung auf, während die AT-Heterozygoten mit 33,5% bzw. 54,8% dazwischen lagen.

Fasste man die Probanden in drei Gruppen zusammen, war eine Unterscheidung von AT-Heterozygoten und Kontrollen anhand des prozentualen Anteils an aberranten Zellen möglich. Betrachtete man die sechs Probanden jedoch getrennt, konnte nach Bestrahlung mit 2,0Gy anders als in der 0,7Gy-Stufe nicht eindeutig zwischen AT-Heterozygoten und Kontrollen unterschieden werden, da Kontrolle 3 nach 2,0Gy-Bestrahlung mit 57,7% mehr aberrante MPP aufwies als AT-Het 1 mit 44,7%.

Das Ergebnis zeigte, dass eine sichere Unterscheidung der Heterozygoten von den Kontrollen durch die erhebliche interindividuelle Variabilität enorm erschwert wurde. Dieses Problem war bereits in der Literatur mehrfach diskutiert worden (z.B. Bentzen et al., 1994; Norman et al., 1992; Tucker et al., 1992; Scott et al., 2000; Neubauer et al., 2002).

Verschiedene Autoren berichteten, dass die Unterscheidung von Heterozygoten und Kontrollen anhand der Untersuchung von Lymphocyten durch die enorme Überschneidung der Werte der gemessenen strahleninduzierten Chromosomenaberrationen nicht zuverlässig möglich war (Bender et al., 1985; Wiencke et al., 1992).

5.1.2 Durchschnittliche Bruchrate pro Mitose (B/M)

Anhand der Bruchrate pro Mitose konnte der AT-Homozygote deutlich aufgrund der höchsten Werte mit 1,94 B/M nach 0,7Gy und 6,50 B/M nach 1,4Gy-Bestrahlung identifiziert werden. Auch die beiden AT-Heterozygoten zeigten eine erhöhte Bruchrate nach Bestrahlung. Allerdings konnten nur in der 0,7Gy-Stufe beide mit Bruchraten von 1,182 für AT-Het 1 und 0,448 für AT-Het 2 von den drei Kontrollen differenziert werden. Nach 2,0Gy-Applikation ergab sich für Kontrolle 3 eine Rate von 1,719 B/M, die höher lag als der Wert für AT-Het 1 mit 1,223 B/M.

In diesem Fall war demnach anhand der durchschnittlichen Bruchrate keine klare Abgrenzung der beiden AT-Heterozygoten von den Kontrollen möglich.

Auch diese Resultate zeigten eine grosse interindividuelle Variabilität, die bereits von anderen Autoren als problematisch erkannt wurde (Stumm et al., 2001, Neubauer et al., 2002, Kuechler et al., 2002, Martin et al., 2003, Distel et al., 2006).

Analog zum zuvor betrachteten Anteil an aberranten Zellen konnte eine Unterscheidung anhand der Bruchrate pro Mitose erfolgen, indem die Probanden in die drei Gruppen Kontrollen, AT-Homozygoter und AT-Heterozygote zusammengefasst wur-

den. So ergaben sich in den unbestrahlten Proben für die Kontrollen 0,033 B/M, für AT-Heterozygote 0,046 B/M und 0,121 B/M für den AT-Homozygoten.

Nach 0,7Gy-Bestrahlung konnten bei den Kontrollen 0,252 B/M erfasst werden, während die AT-Heterozygoten mit einer 3,2fach höheren Bruchrate von 0,815 B/M differenziert werden konnten. Der AT-Homozygot wies 1,939 B/M auf, was dem 2,4fachen Wert der AT-Heterozygoten entsprach, und konnte in der 0,7Gy-Stufe klar von Heterozygoten und Kontrollen unterschieden werden.

Nach 2,0Gy-Applikation waren bei den AT-Heterozygoten mit 2,046 B/M 1,5fach so viele Chromosomenbrüche zu verzeichnen wie bei der Gruppe der Kontrollen mit 1,317 B/M. Deutlich konnte der AT-Patient abgegrenzt werden, der mit 6,495 B/M eine 3,2fache Bruchrate wie die Heterozygoten aufwies.

Die durchschnittliche Bruchrate pro Mitose könnte somit ein geeigneter Parameter zur Erfassung *in vitro* strahleninduzierter chromosomaler Veränderungen sein. In der vorliegenden Studie sollten zunächst Basisdaten bzw. Referenzbereiche erfasst werden, falls die Methode zur Abschätzung der Strahlensensitivität geeignet wäre.

Allerdings war die Unterscheidung von AT-Heterozygoten und Kontrollen nur mit grossen Einschränkungen möglich. Unterschiede liessen sich abgrenzen, wenn die Probanden in drei Gruppen zusammengefasst wurden. Diese Unterschiede waren jedoch nur gering und mit geringer Trennschärfe. Zudem muss die Zusammenfassung mehrerer Probanden in eine Gruppe sehr kritisch betrachtet werden, da im Prinzip ja die individuelle Radiosensitivität anhand bestimmter Parameter, also jeder Proband für sich, charakterisiert werden sollte.

5.1.3 Durchschnittliche Bruchrate (B/M) bei drei und 24 ausgewerteten Chromosomen

Bei der Auswertung der B/M wurden im Ergebnisteil die Unterschiede in der Bruchrate bei den ausgewählten Chromosomen eins, zwei und vier sowie der Bruchrate nach Einbeziehung aller 24 Chromosomen dargestellt. Somit wurde anhand der gewonnenen M-FISH-Daten eine Beurteilung der Bruchrate mit der 3-Farb-FISH-Methode simuliert.

Wie erwartet lagen die resultierenden Bruchwerte pro Mitose bei Auswertung aller 24 Chromosomen deutlich höher als bei Betrachtung der Chromosomen eins, zwei und vier. Allerdings konnten Unterschiede in den Bruchraten pro Proband und Bestrah-

lungsstufe bereits nach Auswertung der drei ausgewählten Chromosomen erkannt werden. Die Faktoren, um die sich die Bruchraten pro Mitose nach Auswertung der Chromosomen 1, 2 und 4 verglichen mit der Gesamtbruchrate nach M-FISH-Auswertung unterschieden, waren ähnlich für die jeweiligen Probanden und Bestrahlungsstufen.

Da nach Stephens et al. (1990) die Chromosomen 1, 2 und 4 etwa 22% der DNA des Genoms repräsentieren, entsprach abgesehen von zwei Werten (Kontrolle 1 2,0Gy: 15,3% und Kontrolle 3 0,7Gy: 37,2%) der prozentuale Anteil der auf diese drei Chromosomen entfallenden Brüche vom Gesamtbruchwert je Proband und Strahlendosis etwa dem vom DNA-Gehalt abhängigen erwarteten Anteil an Brüchen, d.h. bewegte sich zwischen 19,2% und 28,4%. Aufgrund der begrenzten Anzahl der je Proband ausgewerteten Metaphasen in dieser Studie ist es nicht möglich, die Frage nach einer dem DNA-Gehalt entsprechenden Beteiligung der Chromosomen an strahleninduzierten Aberrationen zu beantworten. Die vorliegenden Daten deuten jedoch darauf hin, dass der DNA-Gehalt mit der Bruchwahrscheinlichkeit der einzelnen Chromosomen korrelieren könnte.

Eine Reduktion der Anzahl der ausgewerteten MPP auf die ersten 50 je Proband und Bestrahlungsstufe erlaubte bereits eine Differenzierung des AT-Homozygoten von Heterozygoten und Kontrollen anhand der durchschnittlichen Bruchrate. Auch hierbei konnte eine Tendenz für die B/M bereits an den Ergebnissen von nur drei ausgewerteten Chromosomen abgelesen werden.

Anhand dieser Resultate konnte dargelegt werden, dass bereits bei einer Anzahl von 50 ausgewerteten MPP Ermittlung der Bruchrate pro Mitose für die Chromosomen eins, zwei und vier eine klare Differenzierung des AT-Homozygoten von Heterozygoten und Kontrollen möglich war. Demzufolge könnte bei alleiniger Verwendung des Parameters der durchschnittlichen Bruchrate pro Mitose zur Detektion erhöhter *in vitro* Strahlensensitivität der 3-Farb-FISH als kostengünstigerer Methode mit geringerem Arbeitsaufwand und geringeren technischen Erfordernissen gegenüber der M-FISH der Vorzug gegeben werden.

5.1.4 Durchschnittliche Zahl an CCR/M

Die Erfassung komplexer chromosomaler Umbauten als Parameter für erhöhte individuelle Radiosensitivität wurde ebenfalls in der vorliegenden Studie geprüft. CCR

treten in unbestrahlten Zellen als spontane Aberrationen sehr selten auf. Neubauer et al. (1997) konnten in ihrer Studie erstmals Hinweise auf die Bedeutung des erhöhten Anteils an registrierten CCR in bestrahlten Zellen für die Identifikation von Patienten mit verstärkter klinischer Strahlenreaktion belegen.

Im Vergleich zur Bruchrate pro Mitose ergaben sich nach Analyse der durchschnittlichen Zahl an CCR/M Parallelen. Klar konnte der AT-Homozygote mit 0,12 CCR/M nach 0,7Gy-Bestrahlung und 0,83 CCR/M nach einer Dosis von 1,4Gy identifiziert werden. In der 0,7Gy-Stufe ergaben sich sowohl für Kontrolle 3 als auch für den AT-Heterozygoten 2 (AT-Het 2) Werte von 0,04 CCR/M, weshalb nur der AT-Heterozygote 1 (AT-Het 1) mit 0,07 CCR/M sicher von den Kontrollen abgegrenzt werden konnte. Auch die Auswertung nach 2,0Gy-Bestrahlung erlaubte keine klare Differenzierung zwischen AT-Heterozygoten und Kontrollen. Hier konnte nur AT-Het 2 anhand einer höheren Rate von 0,27 CCR/M von den Kontrollen unterschieden werden, während der Wert für AT-Het 1 mit 0,1 CCR/M unter dem höchsten für die Kontrollen berechneten Wert mit 0,12 CCR/M lag.

Auch in der vorliegenden Studie erwies sich die Abgrenzung der Heterozygoten von den Kontrollen anhand des Anteils an CCR/M als schwierig, womit sich Parallelen zur Arbeit von Kuechler et al. (2002) ergeben, wo der NBS-Homozygote klar anhand dieses Parameters identifiziert werden konnte, während die Rate an CCR/M für NBS-Heterozygote und Kontrollen etwa gleich gross war.

Wie auch bei der Untersuchung der B/M konnte eine Unterscheidung von Heterozygoten und Kontrollen lediglich durch Zusammenfassung der Probanden in drei Gruppen erreicht werden. So konnten nach 0,7Gy-Bestrahlung die AT-Heterozygoten, die mit 0,05 CCR/M eine etwa doppelt so hohe Rate wie die Kontrollen mit 0,02 CCR/M zeigten, differenziert werden. Die Rate an CCR/M war beim AT-Patienten mit 0,12 nochmals etwa doppelt so hoch wie bei der Gruppe der Heterozygoten und erlaubte eine klare Abgrenzung. Nach einer Dosis von 2,0Gy fanden sich bei den Heterozygoten mit 0,17 CCR/M mehr als doppelt so viele komplexe Umbauten wie bei den Kontrollen mit 0,07 CCR/M.

Die Identifikation des AT-Homozygoten anhand der komplexen Rearrangements, deren Rate mit 0,83 CCR/M 4,8 mal so hoch wie die der Heterozygoten war, gelang wie auch die Unterscheidung anhand der Bruchrate pro Mitose problemlos.

Die Rate an CCR/M ermöglichte folglich eine klare Abgrenzung des AT-Patienten von Heterozygoten und Kontrollen. Bei der Untersuchung komplexer chromosomaler

Umbauten bietet die Anwendung der M-FISH gegenüber der 3-Farb-FISH den Vorteil der detaillierten Erfassung der registrierten strahleninduzierten Chromosomenaberrationen

5.1.5 Verteilung der einzelnen Aberrationstypen

Mittels M-FISH erweiterte sich im Vergleich zur konventionellen Zytogenetik das Spektrum detektierbarer Aberrationstypen, insbesondere die Charakterisierung von CCR wurde erleichtert. Den Hauptbeitrag zu quantitativen Unterschieden anhand chromosomaler Veränderungen zwischen dem AT-Patienten und den Heterozygoten sowie Kontrollen stellten allerdings nicht die CCR, sondern einfache Umbauten wie Translokationen und Dicentrische dar. Die Analyse ergab eine unterschiedliche prozentuale Verteilung der einzelnen Aberrationstypen nach *in vitro*-Bestrahlung für die drei Gruppen. Sowohl nach Bestrahlung mit 0,7Gy als auch mit 2,0Gy bildeten die reziproken Translokationen bei der Gruppe der Kontrollen den Hauptteil, während die Rate an nichtreziproken Translokationen bei den Kontrollen in beiden Bestrahlungsstufen weniger als halb so gross war. Der AT-Patient hingegen wies nach 0,7Gy mit 20,6% und nach einer Dosis von 1,4Gy mit 24% deutlich mehr nichtreziproke Translokationen als reziproke Translokationen auf, was als Folge der zunehmenden Zahl an Bruchereignissen pro Metaphase und der zunehmenden Anzahl und Komplexität der chromosomalen Umbauten bei dem AT-Homozygoten interpretiert werden könnte.

Ein wesentlicher Unterschied fand sich bei der Verteilung des Anteils an CCR in den beiden Bestrahlungsstufen. Während nach 0,7Gy-Applikation in allen drei Gruppen mit etwa 20% der gleiche Prozentsatz an komplexen Umbauten registriert wurde, fanden sich in der 2,0Gy-Stufe bei den AT-Heterozygoten mit 26,7% ungefähr doppelt so viele CCR wie bei den Kontrollen mit 13,7%. Nach 1,4Gy-Bestrahlung konnten bei dem AT-Homozygoten 41,3% CCR ermittelt werden, was etwa dem dreifachen Wert der Kontrollen entsprach. Allein anhand dieses Parameters war demzufolge in dieser Studie keine Identifikation des AT-Patienten nach 0,7Gy-Bestrahlung möglich. In der 2,0Gy-Bestrahlungsstufe konnte der prozentuale Anteil an komplexen Rearrangements zur Identifikation des AT-Patienten und der Heterozygoten herangezogen werden. Dieses Ergebnis erbrachte eine Übereinstimmung mit den Daten von Kuechler et al., 2002, wo eine Verdopplung des Anteils an CCR bei einem NBS-

Homozygoten im Vergleich zu NBS-Heterozygoten und Kontrollen nach Bestrahlung beschrieben wurde.

Ausserdem konnte durch die vorliegenden Resultate die These anderer Autoren gestützt werden, die eine mögliche Identifikation erhöhter Strahlensensitivität anhand einer gesteigerten Rate an CCR postulierten (Neubauer et al., 1997).

Im Hinblick auf die Häufigkeit dicentrischer Chromosomen zeigte die Analyse nach 0,7Gy-Bestrahlung, dass mit 39,7% Dicentrischen beim AT-Patienten der Anteil fast dem Doppelten der Kontrollen entsprach. Mit steigender Strahlendosis verminderte sich parallel zum Anstieg des Teils der CCR die Fraktion an dicentrischen Chromosomen beim AT-Homozygoten, die mit 17,3% nur noch halb so hoch war wie bei Heterozygoten und Kontrollen. Die auch in dieser Studie gefundene Überrepräsentation von Translokationen im Vergleich zu Dicentrischen bei AT-Patienten steht in Einklang mit den Daten von Neubauer et al. (2002).

5.2 Identifikation des AT-Homozygoten

Die M-FISH-Methode konnte in dieser Studie erfolgreich zur Quantifizierung und genauen Charakterisierung strahleninduzierter Chromosomenaberrationen bei genetisch determinierter erhöhter Strahlensensitivität eingesetzt werden. Ein AT-Patient konnte klar anhand des grössten prozentualen Anteils an aberranten Zellen, anhand einer höheren Bruchrate pro Mitose und höheren Rate an CCR/M von klinisch unauffälligen Kontrollen und AT-Heterozygoten abgegrenzt werden. Ausserdem wurden bei dem AT-Homozygoten die grösste maximal auftretende Zahl von Chromosomenbrüchen in einer Zelle sowie nach 1,4Gy-Bestrahlung der höchste Prozentsatz an Bruchereignissen, die in die Formation von CCR involviert waren, registriert.

Auch Neubauer et al. (1997) fanden bei Patienten nach Radiotherapie sowie nach *in vitro*-Testung von Lymphozyten einen drastischen Anstieg der Rate an CCR und konnten klinische „Überreagierer“ anhand dieses Parameters detektieren.

Eine weitere Studie mit Anwendung der M-FISH konnte einen NBS-Homozygoten anhand der höchsten Rate an CCR/M sowie Brüche pro Mitose (B/M) von NBS-Heterozygoten und Kontrollen abgrenzen (Kuechler et al., 2002), wobei eine Differenzierung der heterozygoten NBS-Genträger von den Kontrollen anhand dieser Parameter nicht möglich war. Zum gleichen Resultat führten die Untersuchungen in der vorliegenden Studie, die keine eindeutige Unterscheidung zwischen AT-

Heterozygoten und klinisch unauffälligen Kontrollen zuließ, wenn alle Probanden einzeln betrachtet wurden. Diese Aussage steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Neubauer et al. (2002), die in ihrer Studie durch Verwendung der 3-Farb-FISH sowohl nach Applikation von 0,7Gy als auch von 2,0Gy eine eindeutige Identifizierung der AT-Heterozygoten verzeichnen konnten.

In der vorliegenden Studie gelang, wie bereits im Ergebnisteil dargestellt, keine Differenzierung zwischen Heterozygoten und Kontrollen anhand der Parameter B/M und CCR/M, da sich die Werte in einer ähnlichen Größenordnung bewegen.

Die Schwierigkeit der klaren Unterscheidung könnte ursächlich in der Vielzahl und dem Zusammenwirken unbekannter Gene liegen, die an der Ausprägung der individuellen Strahlensensitivität beteiligt sind. Ausserdem könnten unbekannte epigenetische Faktoren (Turesson et al., 1996) und patientenbezogene Faktoren wie Alter, verschiedene Co-Morbiditäten, Nikotinabusus etc. eine Rolle spielen (Bentzen et al., 1994).

In der vorliegenden Studie erfolgte die Auswertung strahleninduzierter Chromosomenschäden in der G₀-Phase. Bei den Kontrollen handelte es sich um klinisch völlig unauffällige Personen. Allein ein Vergleich der Ergebnisse dieser drei Probanden ergab Hinweise auf die ausgeprägte Heterogenität innerhalb dieser Gruppe. So fanden sich beispielsweise in den unbestrahlten Proben der Kontrolle 3 10 Bruchereignisse, während Kontrolle 1 und 2 in den 0Gy-Proben keinerlei Aberrationen aufwiesen. Auch der Anteil an CCR/M nach 0,7Gy-Bestrahlung variierte stark zwischen den Kontrollen, wo für K2 0,01 CCR/M gegenüber 0,04 CCR/M für K3 registriert wurden. Ebenso wurde ein grosser interindividueller Unterschied im Verhalten der Zellen der beiden heterozygoten AT-Träger nach *in vitro* Bestrahlung ersichtlich. Die Heterogenität bei chromosomalen Instabilitätssyndromen ist insbesondere bei der AT ausgeprägt, da eine Vielzahl verschiedener, z.T. seltener ATM-Genmutationen diese Erkrankung bedingen können. Mehr als 500 pathologische Allelvarianten sind bekannt (Gatti et al., 1999). Die bestehende Allelheterogenität könnte ebenfalls teilweise für die beobachteten Unterschiede innerhalb der Gruppe der AT-Heterozygoten verantwortlich sein (Neubauer et al., 2002).

Da die aus venösem Blut gewonnenen T-Lymphocyten von AT-Patienten und AT-Heterozygoten zu wenig Zellmaterial liefern, wurden lymphocytäre Zelllinien verwen-

det. Diese wiesen eine höhere Proliferationsrate und damit einen grösseren Mitoseindex auf (Neitzel et al., 1986).

Für die *in vitro*-Testung der Lymphozyten wurden Strahlendosen von 0,7Gy und 2,0Gy gewählt, da nach Applikation von 0,7Gy laut Literatur eine besonders gute Diskriminierung von AT-Heterozygoten gelang (Neubauer et al., 1997) und eine Dosis von 2,0Gy als typische tägliche Einzeldosis gilt, die in zahlreichen anderen strahlenbiologischen Arbeiten eingesetzt wurde (Löffler et al., 1990; Norman et al., 1992; Geara et al., 1993; Neubauer et al., 2002).

Bereits eine Bestrahlung mit 0,7Gy war ausreichend, um den AT-Patienten anhand der höchsten Bruchrate pro Mitose sowie grössten Zahl an CCR/M von Heterozygoten und Kontrollen abzugrenzen. Wegen der schlechteren Kultivierbarkeit der Zellen bzw. niedrigem Mitoseindex nach Radiatio mit 2,0Gy wurde die zweite Bestrahlungsstufe bei dem AT-Homozygoten auf 1,4Gy reduziert. Nach Applikation der höheren Strahlendosis von 2,0Gy traten die Unterschiede zwischen dem AT-Patienten und den anderen Probanden deutlicher in Erscheinung. Dabei konnte das Vorliegen komplexer chromosomaler Rearrangements den AT-Homozygoten am effektivsten in qualitativer Hinsicht identifizieren. CCR waren bereits zuvor als sensitive Marker für erhöhte Strahlenempfindlichkeit beschrieben worden (Neubauer et al., 1997; Anderson et al., 2002).

5.3 Beteiligung einzelner Chromosomen an den Bruchereignissen

Eine interessante Fragestellung im Zusammenhang mit der Häufigkeit von Bruchereignissen war, ob strahleninduzierte Aberrationen im Genom zufällig verteilt sind, oder ob einzelne Chromosomen häufiger an Bruchereignissen beteiligt sind als andere. Wäre dies der Fall, könnte sich die Entwicklung von Tests zur Bestimmung der Strahlensensitivität möglicherweise auf diese Chromosomen konzentrieren.

Zunächst ist kritisch anzumerken, dass es sich bei der vorliegenden Untersuchung um eine Studie mit sehr kleiner Fallzahl handelt. Diese bedingt eine erhöhte Anfälligkeit für zufällige Fehler. Eine statistische Analyse der Abweichung von der erwarteten Bruchwahrscheinlichkeit aufgrund der kleinen Fallzahl ist ebenfalls nicht sinnvoll.

Bereits in der unbestrahlten Probe finden sich bei Heterozygoten und Homozygoten Abweichungen von der erwarteten Chromosomenbruchwahrscheinlichkeit. Diese sind bei Heterozygoten auf den Chromosomen 1,5,6 und 8 am deutlichsten. Bei Chromosom 8 handelt es sich um die grösste im Rahmen der Studie beobachtete Abweichung. Bei dieser Abweichung handelt es sich am ehesten um einen zufälligen Fehler.

Eine Abweichung von der anhand der entsprechend dem DNA-Gehalt bzw. der Chromosomenlänge erwarteten Bruchbeteiligung der einzelnen Chromosomen an Bruchereignissen nach Bestrahlung wurde in der Literatur beschrieben. Die Ergebnisse bisheriger Studien sind jedoch heterogen. Einige Studien beschreiben eine nicht dem DNA-Gehalt proportionale Beteiligung der Chromosomen an Aberrationen (Knehr et al., 1996; Barquinero et al., 1998; Braselmann et al., 2003) oder eine nicht-signifikante Abweichung von der entsprechend des DNA-Gehaltes erwarteten Beteiligung der Chromosomen an strukturellen Umbauten (Natarajan et al., 1992; Tucker et al., 1993; Matsuoka et al., 1994).

Allerdings muss betont werden, dass in einigen Studien nicht das gesamte Genom untersucht wurde (Neubauer et al. 1997, Keller et al. 2004a). Zudem weisen die bisherigen Befunde auf Abweichungen auf unterschiedlichen Chromosomen hin.

Neubauer et. (1997) untersuchten die Bruchhäufigkeit auf den Chromosomen 1,2 und 4 mittels 3-Farb-FISH und fanden eine Häufung von Chromosomenbrüchen auf den Chromosomen 1 und 4. Überdurchschnittlich viele Brüche auf Chromosom 1 fanden sich auch in der vorliegenden Untersuchung, allerdings muß kritisch ange-

merkt werden, daß sich in der vorliegenden Untersuchung bereits ohne Bestrahlung eine Überrepräsentation von Brüchen auf diesem Chromosom zeigte.

In der Studie von Braselmann et al. (2003) war Chromosom 2 bezüglich der registrierten symmetrischen Translokationen unterrepräsentiert, während Chromosom 4 gemessen an seinem DNA-Gehalt häufiger in Umbauten involviert war als erwartet. Eine Überrepräsentation von Chromosom 4 wurde auch in der Arbeit von Knehr et al. (1996) postuliert, in der 12 ausgesuchte Chromosomen des Chromosomensatzes untersucht wurden.

Eine relevante Unterrepräsentation von Brüchen auf Chromosom 2 zeigte sich in der vorliegenden Untersuchung nicht. Vermehrte Bruchereignisse auf Chromosom 4 waren in der vorliegenden Untersuchung nur nach Bestrahlung mit 0,7Gy, nicht jedoch nach 2,0Gy, nachweisbar. Auch eine von Braselmann und Kollegen (Braselmann et al., 2003) beschriebene vermehrte Beteiligung der Chromosomen 15 und 22 konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht sicher repliziert werden.

Cigarran et al. (1998) untersuchten die Beziehung zwischen DNA-Gehalt der einzelnen Chromosomen und ihrer Empfindlichkeit gegenüber dem klastogenen Effekt ionisierender Strahlung mittels FISH. Sie konnten ebenfalls keine signifikante DNA-Gehalt-abhängige Beteiligung der Chromosomen nachweisen. Sie basierten ihre Schätzung der Wahrscheinlichkeit für chromosomale Umbauten proportional zum „Oberflächengebiet“ eines hypothetischen Chromosomenterritoriums.

Zusammenfassend müssen die vorliegenden Ergebnisse für Abweichungen auf einzelnen Chromosomen insgesamt mit grosser Zurückhaltung interpretiert werden, da aufgrund der kleinen Fallzahl eine sehr hohe Anfälligkeit für zufällige Fehler besteht. Auch die in der Literatur berichteten Ergebnisse sind insgesamt sehr heterogen. Ein deutlicher Trend für die Über- oder Unterrepräsentation bestimmter Chromosomen lässt sich zum momentan weder aus der Literatur noch aus der vorliegenden Untersuchung ableiten. Nötig wären Untersuchungen mit erheblich größerer Fallzahl und höherer Zahl an ausgewerteten Metaphasen.

5.4 Vor- und Nachteile sowie Grenzen der M-FISH-Technik

Greulich et al. (2000) und Kuechler et al. (2002) verwendeten in ihren Studien zur Untersuchung von Chromosomenaberrationen nach Strahleneinwirkung die M-FISH-Technik, um eine exaktere Erfassung der chromosomalen Umbauten zu erzielen.

Auch in der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die M-FISH-Technik eine detaillierte Charakterisierung strahleninduzierter Chromosomenaberrationen ermöglicht. Vor allem die Zusammensetzung komplexer chromosomaler Umbauten konnte genauer untersucht werden. Ein weiterer Vorteil der Methode lag darin, dass die verwendeten peripheren Blutlymphocyten leicht zu gewinnen und gut kultivierbar waren. Bei der M-FISH-Analyse war allerdings die Karyotypisierung wesentlich aufwändiger als bei 3-Farb-FISH und erforderte eine umfangreichere technische Ausstattung. Nachteile der *in situ* Hybridisierung ergaben sich neben den hohen Kosten auch daraus, dass nicht immer gleich gute Hybridisierungsergebnisse erreicht werden konnten. Als problematisch erwies sich insbesondere die Verwendung von Zelllinien, auf denen die Sondenhybridisierung mitunter sehr schlechte und damit nicht auswertbare Ergebnisse lieferte.

Das Auflösungsvermögen der M-FISH-Technik ist quantitativ auf chromosomale Veränderungen bis zu einer Grösse von ca. 150-200kB (Speicher et al., 1996) sowie bezüglich bestimmter Aberrationen limitiert, so dass kleinere intrachromosomale Umbauten wie perizentrische Inversionen, interstitielle Deletionen und Insertionen übersehen werden können (Greulich et al., 2000).

Die Problematik der Detektion intrachromosomaler Umbauten versuchte man bereits durch die Verwendung armspezifischer Sonden bei FISH-Untersuchungen anzugehen (Guan et al., 1996; Natarajan et al., 1996). Eine verfeinerte Chromosomenanalyse und die Möglichkeit zur exakten Lokalisation von Bruchpunkten würde das Multicolorbanding liefern (Senger et al., 1998). Johannes et al. (1999) erforschten strahleninduzierte Aberrationen mittels multicolor banding FISH, allerdings lediglich am Beispiel des menschlichen Chromosom 5. Die simultane Anwendung des multicolor bandings (MCB) auf alle 24 Chromosomen (Weise et al., 2003) wäre zur Erfassung chromosomaler Strahlenschäden ungeeignet, da die Auswertung einen immens hohen Arbeits- und Zeitaufwand erfordern würde. Die statistische Beurteilung der Resultate wäre ebenfalls problematisch; orientierend müssten zusätzlich M-FISH-

Untersuchungen zur Ermöglichung einer statistischen Datenverwertung vorgenommen werden.

Ein möglicher limitierender Faktor der vorliegenden Untersuchung ist die Zahl der ausgewerteten Metaphasen. Es wurden 100-156 Metaphasen pro Person und Bestrahlungsstufe ausgewertet. Dies ist im Vergleich zu Neubauer et al. (1997), die 1600 MPP untersuchten, verhältnismässig wenig. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass bei der M-FISH-Methode im Vergleich zur 3-Farb-FISH 24 Chromosomen pro Metaphase statt drei auszuwerten waren. Laut einer 2004 von Keller et al. publizierten Arbeit sollten bezüglich des Parameters B/M zur Untersuchung spontaner Chromosomenaberrationen mindestens 500 MP, nach Bestrahlung mit 2,0Gy mindestens 150 Metaphasen untersucht werden, um aussagekräftige Resultate zu erzielen. Dieser Standard wurde bei der vorliegenden Untersuchung somit nicht bei allen Probanden und Bestrahlungsstufen erreicht (Keller et al., 2004b).

Die Beschränkung auf 100-156 Metaphasen in dieser Untersuchung erfolgte aufgrund des enormen Arbeitsaufwands dieser Art von Untersuchung. Dieser stellt sicher auch eine bedeutsame Limitation für die Anwendbarkeit der M-FISH dar. Als Routineuntersuchung für Strahlenpatienten kommt die M-FISH deswegen derzeit nicht in Frage. Dennoch sind weitere Untersuchungen sinnvoll, insbesondere sollten aus statistischen Gründen grössere Zellzahlen untersucht werden, da gegebenenfalls eine Automatisierung der Auswertung von FISH-Untersuchungen zukünftig genutzt werden könnte.

5.5 Problematik prädiktiver Tests

Das Hauptziel eines prädiktiven radiobiologischen Tests ist die Bestimmung einer möglichen Korrelation zwischen dem Ausmaß strahleninduzierter Chromosomenschäden und der Tumor- bzw. Normalgewebsreaktion nach Radiotherapie.

Fernziel ist ein Test, der eine prädiktive Einschätzung des Nebenwirkungsrisikos einer Strahlentherapie erlaubt. Somit könnten Unter- und Überreagierer erfasst und die Radiotherapie individuell angepasst werden. Da hierfür noch keine geeignete Untersuchungsmethode gefunden wurde, ist neben anderen bereits erprobten Techniken (siehe Einleitung) ein möglicher Schritt die Untersuchung chromosomaler Veränderungen auf ihre Tauglichkeit für einen solchen Test. Diese Fragestellung ist ein Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Verkompliziert wird die Entwicklung prädiktiver Tests durch die enorme interindividuelle Variation der Strahlensensitivität, die eine Kategorisierung der untersuchten Probanden bezüglich ihrer Radiosensitivität erschwert (Löffler et al., 1990; Tucker et al., 1992; Burnet et al., 1994; Turesson et al., 1996, Neubauer et al., 2002, Kuechler et al., 2002, Distel et al., 2006).

Das Screening nach sogenannten „Überreagierern“ ist problematisch, da sich aufgrund der niedrigen Prävalenz dieser in der Normalbevölkerung bei einem entsprechenden Test ein niedriger positiver Vorhersagewert ergibt (Bentzen et al., 1997).

Der vielleicht kritischste Punkt jedes prädiktiven Tests ist die Schwierigkeit, den Nachweis einer klaren Korrelation zwischen der gemessenen erhöhten *in vitro* Strahlensensitivität eines Individuums und dem entsprechenden Level der klinischen Strahlenreaktion *in vivo* zu erbringen. Die Datenlage diesbezüglich ist konträr. So konnten Geara et al. (1993), Dunst et al. (1998) und Hagmar et al. (2004) einen Zusammenhang von erhöhter *in vitro* Strahlensensitivität und klinischer Strahlenreaktion bei Radiotherapiepatienten belegen. Sie fanden eine signifikante Korrelation zwischen Fibroblastenempfindlichkeit und Ausprägung ernsthafter Spätreaktionen nach Bestrahlung. Andere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass die Strahlensensitivität *in vitro* getesteter Fibroblasten zur Vorhersage von strahleninduzierten Gewebsfibrosen bei Brustkrebspatientinnen ungeeignet ist, da keine signifikante Korrelation nachweisbar war (Russell et al., 1998; Peacock et al., 2000). Auch Budach et al. (1998) postulierten, dass die mit derzeitigen Verfahren messbare Strahlensensitivität in Lymphocyten und Fibroblasten nicht oder nur sehr schlecht mit dem Ausmaß akuter und später Nebenwirkungen am Normalgewebe korreliert.

Borgmann et al. (2002) fanden heraus, dass die Lymphocyten von „overreactors“ signifikant höhere Raten an chromosomalen Aberrationen aufwiesen als die von Patienten mit milder Strahlenreaktion, was mit den von Neubauer et al. (1996) erhobenen Daten übereinstimmt. Die in der gleichen Studie getesteten Fibroblasten ließen hingegen keine Korrelation erkennen, weshalb aus den Studienergebnissen abgeleitet wurde, dass die Testung von Lymphocyten zur Vorhersage der Normalgewebsreaktion nach Radiotherapie vielversprechender ist als die von Fibroblasten.

Oppitz et al. (2002) konnten in einer Kohorte von 32 Brustkrebspatientinnen einen Zusammenhang zwischen mittels comet assay *in vitro* getesteten Lymphocyten und der akuten Strahlenreaktion *in vivo* nachweisen. In einer anderen Arbeit konnten 15 hypersensitive unter 189 Brustkrebspatientinnen identifiziert werden, indem Lympho-

cyten auf die Anzahl von DSB pro Gy und DNA-Einheit getestet wurden (Ruiz de Almodovar et al., 2002). Auch bei der retrospektiven Untersuchung von 86 Brustkrebspatientinnen nach Radiotherapie konnte ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten letaler Chromosomenaberrationen bei *in vitro* bestrahlten Lymphocyten und erhöhter jährlicher Fibroserate aufgedeckt werden (Hoeller et al., 2003). Strasser et al. (2007) untersuchten lymphoblastoide Zelllinien, Lymphocyten und Fibroblasten von ATM-, NBS- und radiosensitiven Krebspatienten nach Bestrahlung mittels Konstantfeldgelelektrophorese, um den Zusammenhang zwischen DNA-Doppelstrang-Reparaturkapazität und Strahlensensitivität zu erforschen. Unter den drei unterschiedlichen Zelltypen war die initiale Anzahl von DNA-Doppelstrangbrüchen sehr ähnlich, mit Ausnahme der signifikant höheren bei den Tumorpatienten. Im Ergebnis war die Reparaturkapazität bei erhöht strahlensensitiven Patienten (RTOG Grad 3 und 4) normal, d.h. es konnten keine vermehrt strahlenempfindlichen Krebspatienten durch erniedrigte DSB-Reparaturkapazität identifiziert werden. Dieses Ergebnis unterstreicht erneut die gegensätzlichen Resultate von Arbeiten bezüglich dieser Problematik.

Zum Teil ist die Korrelation von akuten und späten Reaktionen auf Bestrahlung nicht stark genug, um eine treffende Vorhersage des klinischen Ergebnisses zu ermöglichen (Rogers et al., 2000).

Ziel eines prädiktiven Tests wäre nicht nur, den kleinen Prozentsatz hypersensitiver Patienten herauszufiltern und von Standardstrahlentherapieprotokollen auszuschliessen, sondern für die übrigen Patienten mit resistenterem Normalgewebe eine maximale Ausnutzung der Möglichkeiten der Radiotherapie umzusetzen.

Dafür benötigt man zelluläre Assays, die eine genaue Vorhersage der Normalgewebstoleranz erlauben. Zudem müsste ein solcher prädiktiver Test bezahlbar und in der klinischen Praxis in gewissem Zeitrahmen durchführbar sein.

Weissberg et al. (1998) konnten in einer Studie keinen Beweis für abnorm erhöhte klinische Strahlensensitivität bei AT-Heterozygoten erbringen, die aufgrund von Mamma- und Prostatakarzinomen bestrahlt wurden. Auch Ramsey et al. (1995), Appleby et al. (1997) und Oppitz et al. (1999) konnten mittels Sequenzanalyse bei Patienten mit klinisch beobachteten starken Bestrahlungsnebenwirkungen am tumorumgebenden Normalgewebe keine Häufung von heterozygoten ATM-Mutationen detektieren. Bremer et al. (2003) identifizierten in ihrer Studie unter Brustkrebspatientinnen, die Radiotherapie erhielten, 11 heterozygote AT-Mutationsträgerinnen, die

jedoch keine verstärkte klinische Strahlenreaktion aufwiesen. Diese Daten zeigen, dass das Screening bezüglich bestimmter Gendefekte, wie z.B. ATM-Mutationen, zur prädiktiven Vorhersage klinischer Hypersensitivität gegenüber ionisierender Strahlung ungeeignet ist.

Kürzlich publizierte Daten belegen die Entwicklung eines Tests zur Identifikation von AT-Homozygoten und -Heterozygoten. Dieser beruht auf dem Durchflusszytometrie (flow cytometry) -basierten ATM-Kinase-Assay, der die ATM-abhängige Phosphorylierung des SMC1-Proteins (structural maintenance of chromosome 1) nach DNA-Schädigung durch ionisierende Strahlen oder Zytostatika nachweist (FC-pSMC1 assay) (Nahas et al., 2009). Durch diesen Test konnte die Zeit zur Identifikation von AT-Homozygoten und -Heterozygoten von 3 Monaten auf etwa 3h verkürzt werden. Ein solcher molekulargenetischer Test zur Identifikation spezifischer Mutationen, wie o.g. zur Identifikation von AT-Homozygoten und Heterozygoten erscheint jedoch zur Erkennung erhöhter Strahlensensitivität nicht angemessen, da das ATM-Gen nur eines von vielen anderen bekannten Genen darstellt, die an der Ausprägung der Strahlenempfindlichkeit in beteiligt sind.

Bennett et al. (2001) fanden bei der Spezies *Saccharomyces cerevisiae* 107 neue Genloci, die mit der Reaktion auf ionisierende Strahlung in Zusammenhang gebracht werden, wobei mehr als 50% davon homolog zu menschlichen Genen sind. Es gibt Versuche, bestimmte genetische Profile zu identifizieren, die mit der Ausprägung erhöhter Radiosensitivität einhergehen könnten (Andreassen, 2005; Barnett et al., 2009). In einer multizentrischen Studie, in der eine Korrelation von strahleninduzierter Apoptose von Lymphocyten und klinischer Strahlenreaktion erforscht wurde, konnte jedoch keine Eignung dieses *in vitro*-Apoptoseassays als prädiktiver Test zur Vorhersage erhöhter Radiosensitivität bestätigt werden (Greve et al., 2009).

5.6 Translokation t(7;14)

Mehrfach wurde in der Literatur eine Häufung von Translokationen t(7;14) im Rahmen spontaner cytogenetischer Abnormalitäten bei AT-Patienten beschrieben (Hecht et al., 1975; Zech and Haglund, 1978; Taylor et al., 1981). So fanden beispielsweise Aurias et al. (1980) Translokationen von Chromosom 7 mit Chromosom 14 in den unbestrahlten Lymphocyten von AT-Homozygoten in einer von 60 Zellen im Vergleich zu 1:2000 Zellen bezüglich der Häufigkeit in der Normalbevölkerung. Die

Bruchpunkte befinden sich auf 14q11 und entweder 7q34 (Typ I) oder 7p13 (Typ II) (Dewald et al., 1986).

In dieser Studie konnte diese Häufung nicht bestätigt werden. In der 0Gy-Bestrahlungsstufe wurde bei dem AT-Homozygoten keine Translokation $t(7;14)$ nachgewiesen. Auch nach Bestrahlung mit 0,7Gy fand sich keine derartige Translokation. Allerdings stellte die Suche nach einer spezifischen Translokation auch keines der Hauptziele dieser Studie dar. Ziel war die Erfassung von strahlenbedingten Veränderungen des gesamten Genoms. Einschränkend kann ferner diskutiert werden, dass in dieser Studie pro Proband und Bestrahlungsstufe nur mindestens 100 bis maximal 159 Metaphasen analysiert wurden. Dies stellt eine relativ geringe Zellzahl für die Erfassung einer spontanen Veränderung an unbestrahlten Zellen dar. Nach Applikation von 1,4Gy und Auswertung von 112 Metaphaseplatten wurden zwei Translokationen, an denen Chromosom 7 und 14 beteiligt waren, identifiziert. Demzufolge lag nach Einwirkung ionisierender Strahlung kein vermehrtes Auftreten der Translokation $t(7;14)$ vor.

5.7 Stabile Translokation

Es ist bekannt, dass Translokationen infolge von Strahlenexposition Jahrzehnte persistieren können (Tucker, 2004). Das Phänomen des Auftretens stabiler Aberrationen nach Strahleneinwirkung wurde bereits von Bauchinger et al. (1998) und Matsumoto et al. (1998) beschrieben.

In dieser Untersuchung trat in der Bestrahlungsstufe von 1,4Gy in 91% der Zellen des AT-Homozygoten eine Translokation mit der Karyotypformel $t(1^*,3)$ auf, die auch häufig in chromosomale Umbauten involviert war. Es handelt sich hierbei wohl um einen klonalen Effekt in der Zellkultur, d.h. dass diese Aberration schon vor der Bestrahlung vorhanden war. Da die Kulturzeit nach Bestrahlung 48h betrug, erscheint dies für eine stabile Translokation nach Radiatio zu kurz; die Zellen wurden in dieser Studie bereits nach einer Zellteilung geerntet.

5.8 Bedeutung komplexer Rearrangements

Durch Einsatz der M-FISH-Methode wurde deutlich, dass CCR häufiger sind als ursprünglich angenommen. Andere Autoren untersuchten bereits das Auftreten sowie den Grad der Komplexität dieser Aberrationen (Savage and Simpson, 1994). Auch wurden verschiedene Klassifikationen zur systematischen Beschreibung der Zusammensetzung der CCR diskutiert (Cornforth, 2001).

Die Bedeutung von CCR bei der Identifizierung von Strahlensensitivität wurde bereits von Neubauer et al. (1997) und Kuechler et al. (2002) erörtert. Übereinstimmend zu diesen Ergebnissen zeigten auch die in dieser Studie erhobenen Daten, dass ein deutlicher Anstieg der Anzahl komplexer Chromosomenaberrationen nach *in vitro*-Bestrahlung vorlag, der die Identifikation eines AT-Homozygoten ermöglichte.

Dabei konnte mit der M-FISH-Methode ein besonders umfassendes Bild dieser komplexen Aberrationen gewonnen werden, das mit anderen Methoden so nicht realisierbar wäre.

5.9 Fazit

Zusammenfassend ist eine Anwendung der M-FISH-Methode als prädiktive Testmethode zur Abschätzung der zellulären Strahlensensitivität in der klinischen Praxis derzeit vermutlich nicht sinnvoll und auch nicht umsetzbar. Grund dafür ist, dass die Methode ebenso wie die 3-Farb-FISH zur Quantifizierung von Strahlenschäden erheblich zu arbeitsaufwändig und zu teuer ist. Die M-FISH könnte erst dann eine in der klinischen Routine anwendbare Methode werden, wenn eine Automatisierung der Metaphasenanalyse am Computer gelingt und somit der Arbeitsaufwand dramatisch sinkt. Auch hat die Methode, wie oben dargelegt, noch erhebliche Probleme in der Spezifität, insbesondere die grosse interindividuelle Variabilität in der zellulären Strahlensensibilität bereitet bei der klaren Abgrenzung einzelner Individuen Probleme.

In der vorliegenden Arbeit konnten Basisdaten gewonnen werden, um strahleninduzierte Chromosomenaberrationen als Parameter besser beurteilen zu können und zukünftig evtl. reduzierte Testparameter daran abzuleiten. So gelang die Identifikation eines AT-Homozygoten anhand verschiedener Parameter wie der Bruchrate pro

Mitose und der Rate an CCR pro Mitose, wobei die Bedeutung komplexer Chromosomenaberrationen zur Erkennung erhöhter Strahlensensitivität, wie bereits in der Literatur beschrieben, durch die vorliegenden Daten bestätigt werden konnte.

Sowohl im Bereich der prädiktiven Erfassung der individuellen Strahlensensitivität von Radiotherapiepatienten als auch im Rahmen der Untersuchung der Strahlenempfindlichkeit einzelner Tumorgewebe ist zusammenfassend noch erhebliche Grundlagenforschung nötig. Neben zellulären Assays gibt es Versuche, genetische Profile zu identifizieren, die eine Vorhersage der Strahlensensitivität von Radiotherapiepatienten vor Beginn der Behandlung ermöglichen (Barnet et al., 2009; Alsner et al., 2008), die sich ebenfalls noch in den Anfängen befinden.

6 Zusammenfassung

Unerwünschte Strahlenwirkungen am Normalgewebe stellen eine schwerwiegende Komplikation der onkologischen Radiotherapie dar. Bisher fehlen in der klinischen Praxis anwendbare prädiktive Tests zur Abschätzung der individuellen Radiosensitivität. Diese Studie stellt eine Grundlagenarbeit zur Anwendbarkeit der M-FISH-Technik für die Detektion von erhöhter Strahlensensitivität dar, wobei die Ataxia teleangiectasia als Modell für erhöhte Strahlensensitivität verwendet wurde.

Insbesondere sollte geklärt werden, ob die M-FISH-Technik eine zuverlässige Detektion einer erhöhten Strahlensensitivität nach *in vitro* Bestrahlung ermöglicht, d.h. eine klare Unterscheidung von Kontrollen und AT-Heterozygoten von einem AT-Homozygoten möglich ist. Fraglich war auch, ob bestimmte Typen von Chromosomenaberrationen für erhöhte Radiosensitivität charakteristisch sind und ob strahleninduzierte Chromosomenbrüche im Genom zufällig verteilt sind. Hierzu wurden *in vitro* strahleninduzierte Chromosomenaberrationen an humanen Lymphocyten und lymphocytären Zelllinien von zwei AT-Heterozygoten, einem AT-Homozygoten und drei Kontrollen untersucht. Als wesentlicher Parameter wurde die durchschnittliche Anzahl der Chromosomenbrüche je Metaphase registriert und alle chromosomalen Umbauten detailliert erfasst. Die Bruchrate nahm bei steigender Bestrahlungsintensität stetig zu. Beim AT-Homozygoten fanden sich hierbei die meisten Chromosomenbrüche pro Mitose (B/M) und die meisten komplexen chromosomalen Rearrangements pro Mitose (CCR/M). Auch fand sich ein deutlicher Anstieg komplexer Chromosomenaberrationen nach *in vitro*-Bestrahlung, was deren Bedeutung für die Identifizierung von Strahlensensitivität unterstreicht. Eine klare Differenzierung zwischen Kontrollen und AT-Heterozygoten anhand der untersuchten Parameter war aufgrund der erheblichen interindividuellen Variabilität aber nicht sicher möglich.

Kein Chromosom war in Bezug auf die Bruchhäufigkeit in beiden Bestrahlungsstufen in relevanter Weise über- oder unterrepräsentiert. Eine zufällige Verteilung der Brüche auf dem Genom mit Zunahme der Chromosomenbrüche bei steigender Strahlendosis und steigendem DNA-Gehalt der Chromosomen scheint vorzuliegen.

Zusammenfassend ist die M-FISH-Methode zu zeitaufwändig, zu teuer und zeigt Probleme in der Spezifität, da zwar eine Identifikation des AT-Homozygoten, nicht jedoch eine klare Abgrenzung zwischen AT-Heterozygoten und Kontrollen aufgrund der grossen interindividuellen Streuung gelang.

7 Literaturverzeichnis

Alsner J, Andreassen CN and Overgaard J (2008) Genetic markers for prediction of normal tissue toxicity after radiotherapy.
Semin Radiat Oncol 18:126-35.

Anderson RM, Stevens DL and Goodhead DT (2002) M-FISH analysis shows that complex chromosome aberrations induced by alpha-particle tracks are cumulative products of localized rearrangements.
PNAS Vol.99 no19:12167-12171.

Andreassen CN, Alsner J, Overgaard J, Herskind C, Haviland J, Owen R, Home-wood J, Bliss J and Yarnold J (2005) TGFB1 polymorphisms are associated with risk of late tissue complications in the breast after radiotherapy for early breast cancer.
Radiother Oncol 75(1):18-21.

Appleby JM, Barber JB and Levine E (1997) Absence of mutations in the ATM gene in breast cancer patients with severe responses to radiotherapy.
Br J Cancer 76:1546-49.

Athma P, Rappaport R and Swift M (1996) Molecular genotyping shows that ataxia-teleangiectasia heterozygotes are predisposed to breast cancer.
Cancer Genet Cytogenet 92:130-134.

Aurias A, Dutrillaux B, Buriot D and Lejeune J (1980) High frequencies of inversions and translocations of chromosome 7 and 14 in ataxia teleangiectasia.
Mut Res 69:369-74.

Barnett GC, West CM, Dunning AM, Elliott RM, Coles CE, Pharoah PD and Burnet NG (2009) Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype.

Nat Rev Cancer 9:134-42.

Bauchinger M, Salassidis K, Braselmann H, Vozilova A, Pressl S, Stephan G, Snigiryova G; Kozheurov VP and Akleyev A (1998) FISH-based analysis of stable translocations in a Techa River population.
Int J Radiat Biol 73(6):605-12.

Begg A, van der Kogel AJ (2008) Clinical radiobiology in 2008.
Radiother Oncol 86(3):295-9.

Bender MA, Rary JM, Kale RP (1985) G₂ chromosomal radiosensitivity in ataxia telangiectasia lymphocytes.
Mut Res 152:39-47.

Bender MA, Awa AA, Brooks AL, Evans HJ, Groer PG, Littlefield G, Pereira C, Preston RJ and Wachholz BW (1988) Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposure to radiation.
Mut Res 196:103-156.

Bennett CB, Lewis LK, Karthikeyan G, Lobachev KS, Yin YH, Sterling JF, Snipe JR and Resnick MA (2001) Genes required for ionizing radiation resistance in yeast.
Nat Genet 29:426-34.

Bentzen SM (1997) Potential clinical impact of normal-tissue intrinsic radiosensitivity testing.
Radiother Oncol 43:121-131.

Bentzen SM (2006) Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology.
Nat Rev Cancer 6:702-13.

Bentzen SM and Overgaard J (1994) Patient-to-patient variability in the expression of radiation-induced normal tissue injury.

Borgmann K, Roper B, El-Awady R, Brackrock S, Bigalke M, Dörk T, Alberti W, Dikomey E and Dahm-Daphi J (2002) Indicators of late tissue response after radiotherapy for head and neck cancer: fibroblasts, lymphocytes, genetics, DNA-repair and chromosome aberrations.

Radiother Oncol 64(2):141-52.

Bourne RG, Kearsley J and Groves WD (1983) The relationship of early and late gastrointestinal complications of radiation for carcinoma of the cervix.

Int J Radiat Oncol Biol Phys 9:1445.

Braselmann H, Kulka U, Huber R, Figel HM and Zitzelsberger H (2003) Distribution of radiation-induced exchange aberrations in all human chromosomes.

Int J Radiat Biol 79(6):393-403.

Branzel D and Foliani M (2008) Regulation of DNA repair throughout the cell cycle.

Nat Rev Mol Cell Biol 9:297-308.

Bremer M, Kloppe K, Yamini P, Bendix-Waltes R, Dörk T and Karstens JH (2003) Clinical radiosensitivity in breast cancer patients carrying pathogenetic ATM gene mutations: no observation of increased radiation-induced acute or late effects.

Radiother Oncol 69(2):155-60.

Broeks A, Urbanus JHM, Floore AN, Dahler EC, Klijn JGM, Rutgers EJT, Devilee P, Russell NS, van Leeuwen FE and Van't Veer LJ (2000) ATM-heterozygous germline mutations contribute to breast cancer susceptibility.

Am J Hum Genet 66:494-500.

Budach W, Claßen J, Belka C and Bamberg M (1998) Clinical impact of predictive assays for acute and late radiation morbidity.

Strahlenther Onkol 174:Suppl3:20-24.

-
- Burnet NG, Wurm R, Nyman J and Peacock JH (1996) Normal tissue radiosensitivity - how important is it?
Clin Oncol 8:25-34.
- Casey J and Davidson N (1977) Rates of formation and thermal stabilities of RNA: DNA and DNA:DNA duplexes at high concentrations of formamide.
Nucleic Acid Research 4:1539-1552.
- Chopra RR and Bogart JA (2009) Radiation therapy-related toxicity (including pneumonitis and fibrosis).
Emerg Med Clin North Am 27(2):293-310.
- Cigarran S, Barrios L and Barquinero JF (1998) Relationship between the DNA content of human chromosomes and their involvement in radiation-induced structural aberrations, analysed by painting.
Int J Radiat Biol 74:449-55.
- Coates PJ, Lorimore SA and Wright EG (2004) Damaging and protective cell signalling in the untargeted effects of ionizing radiation.
Mutat Res 568(1):5-20.
- Coderre JA, Morris GM, Micca PL, Hopewell JW, Verhagen I, Keiboer BJ and van der Kogel AJ (2006) Late effects of radiation on the central nervous system: role of vascular endothelial damage and glial stem cell survival.
Radiat Res 166(3):495-503.
- Cox JD, Stetz J, Pajak BS and Pajak TF (1995) Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC).
Int J Radiat Oncol Biol Phys Vol. 31 No. 5:1341-1346.
- Dahm-Daphi J, Dikomey E and Brammer I (1998) DNA-repair, cell killing and normal tissue damage.
Strahlenther Onkol 174(3):8-11.

-
- Dewald GW, Noonan KJ, Spurbeck JL and Johnson DD (1986) T-lymphocytes with 7;14 translokations: frequency of occurrence, breakpoints and clinical and biological significance.
Am J Hum Genet 38:520-32.
- Distel LV, Neubauer S and Keller U (2006) Individual differences in chromosomal aberrations after *in vitro* irradiation of cells from healthy individuals, cancer and cancer susceptibility syndrome patients.
Radiother Oncol 81(3):257-63.
- Dunst J, Gebhart E und Neubauer S (1995) Kann man erhöhte Strahlensensitivität von Patienten durch *in-vitro*-Testung von Lymphozyten erkennen?
Strahlenther Onkol 171:581-6.
- Dunst J, Neubauer S, Becker A and Gebhart E (1998) Chromosomal *in vitro* radiosensitivity of lymphocytes in radiotherapy patients and AT-Homozygotes.
Strahlenther Onkol 174:510-16.
- Fenech M (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations.
Mutation Res 285:35-44.
- Fenech M and Morley AA (1984) Measurement of micronuclei in lymphocytes.
Mut Res 147:29-36.
- Finnon P, Moquet JE, Edwards AA and Lloyd DC (1999) The ^{60}Co gamma-ray-dose-response for chromosomal aberrations in human lymphocytes analysed by FISH: Applicability to biological dosimetry.
Int J Radiat Biol 75:1215-1222.
- FitzGerald MG, Bean JM, Hedge SR; Unsal H, MacDonald DJ, Harkin DP, Finkelstein DM Isselbacher KJ and Haber DA (1997) Heterozygous ATM-mutations do not contribute to early onset of breast cancer.

Nature Genet 15:307-310.

Frankenberg-Schwager M, Becker M, Garg I, Pralle E, Wolf H und Frankenberg D (2008) The role of nonhomologous DNA end joining, conservative homologous recombination and single strand annealing in the cell cycle-dependent repair of DNA double-strand breaks induced by H₂O₂ in mammalian cells. Radiat Res 170(6):784-93.

Gatti RA, Berkel I, Boder E, Braedt G, Charmley P, Concannon P, Ersoy R, Foroud T, Jaspers NGJ, Lange K, Lathrop GM, Leppert M, Nakamura Y, O'Connell P, Paterson M, Salser W, Sanal O, Silver J, Sparkes RS, Susi E, Weeks DE, Wei S, White R and Yoder F (1988) Localization of an ataxia teleangiectasia gene to chromosome 11q22-23. Nature 336:577-580.

Gatti RA, Boder E, Vinters HV, Sparkes RS, Norman A and Lange K (1991) Ataxia teleangiectasia: an interdisciplinary approach to pathogenesis. Medicine 70:99-117.

Geara FB, Peters LJ, Ang KK, Wike JL and Brock WA (1993) Prospective comparison of *in vitro* normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients. Int J Radiat Biol 27:1173-1179.

Gebhart E, Neubauer S, Schmitt G, Birkenhake S and Dunst J (1996) Use of a three-color *in situ* suppression technique for the detection of past radiation exposure. Radiat Res 145:47-52.

Greulich KM, Kreja L, Heinze B, Rhein AP, Weier H-UG, Brückner M, Fuchs P and Molls M (2000) Rapid detection of radiation-induced chromosomal aberrations in lymphocytes and hematopoietic progenitor cells by mFISH. Mutat Res 452:73-81.

-
- Gu W, Zhang F and Lupski JR (2008) Mechanisms for human genomic rearrangements.
Patho Genetics 1(4):1-17.
- Guan Y, Zhang H, Bittner M, Jiang Y, Meltzer P and Trent J (1996) Chromosome arm painting probes.
Nature Genetics 12:10-11.
- Gupta N, Vij R, Haas-Kogan DA, Israel MA, Deen DF and Morgan WF (1996) Cytogenetic damage and the radiation-induced G₁-phase checkpoint.
Radiat Res 145(3):289-98.
- Hagmar L, Stromberg U and Bonassi S (2004) Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts.
Cancer Res 64(6):2258-63.
- Hecht F, Koler RD, Rigas DA, Dahnke GS, Case MP, Tisdale V and Miller RW (1966) Leukemia and lymphocytes in ataxia teleangiectasia.
Lancet II:1193.
- Hecht F, McKaw BK, Peakman D and Robinson A (1975) Non-random occurrence of 7-14 translokations in human lymphocyte cultures.
Nature 255:243-44.
- Hliscs R, Muhlig P und Claussen U (1997) The spreading of metaphases is a slow process which leads to a stretching of chromosomes.
Cytogenetics and Cell Genetics 76:167-171.
- Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer.
Nature 411:366-374.

-
- Hoeller U, Tribius S, Kuhlmei A, Grader K, Fehlaue F and Alberti W (2003) Increasing the rate of late toxicity by changing the score? A comparison of RTOG/EORTC and LENT/SOMA scores.
Int J Radiat Oncol Biol Phys Vol. 55 No. 4:1013-1018.
- Hoeller U, Borgmann K, Bonacker M, Kuhlmei A, Bajrovic A, Jung S, Alberti W and Dikomei E (2003) Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may be used to predict the risk of fibrosis after radiotherapy for breast cancer.
Radiother Oncol. 2003 Nov;69(2):137-44.
- Hopewell JW and van der Kogel AJ (1999) Pathophysiological mechanisms leading to the development of late radiation-induced damage to the central nervous system.
Front Radiat Ther Oncol 33:265-75.
- Hopewell JW and Withers HR (1998) Proposition: long-term changes in irradiated Tissues are due principally to vascular damage in the tissues.
Med Phys 25(12):2265-8.
- Hsu TC (1952) Mammalian chromosomes *in vitro*-1. karyotype of man.
J Heredity 43:167-172.
- Inskip HM, Kinlen LJ, Taylor AM, Woods CG and Arlett CF (1999) Risk of breast cancer and other cancers in heterozygotes for ataxia-teleangiectasia.
Br J Cancer 79(7-8):1304-7.
- ISCN (2005) An International System for Human Cytogenetic Nomenclature: Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature "The Normal Human Karyotype G- and R-bands". Editors: Schaffer LG and Tommerup N. Published in collaboration with "Cytogenetic and Genome Research"

-
- Johannes C, Chudoba I and Obe G (1999) Analysis of X-ray-induced aberrations in human chromosome 5 using high-resolution multicolour banding FISH (mBAND).
Chromosome Res 7(8):625-33.
- Johnson KL, Tucker JD and Jodinger N (1998) Frequency, distribution and clonality of chromosome damage in human lymphocytes by multi-color FISH.
Mutagenesis 13:217-227.
- Jones LA, Scott D, Cowman R and Roberts SA (1995) Abnormal radiosensitivity of lymphocytes from breast cancer patients with excessive normal tissue damage after radiotherapy: Chromosome aberrations after low-dose irradiation.
Int J Radiat Biol 67:519-528.
- Joksic G, Stankovic M, Radovanovic S and Dragic M (2001) The use of cytochalasin Block (CB) micronucleus test to identify clastogenic and antiproliferative Action of tiazofurin.
Archive of Oncology 9(1):47-48.
- Keller U, Kuechler A, Liehr T, Müller E, Grabenbauer G, Sauer R and Distel L (2004a) Impact of various parameters in detecting chromosomal aberrations by FISH to describe radiosensitivity.
Strahlenther Onkol 180(5):289-96.
- Keller U, Grabenbauer G, Kuechler A, Sauer R and Distel L (2004b) Technical report. Radiation sensitivity testing by fluorescence *in situ* hybridisation: how many metaphases have to be analysed?
Int J Radiat Biol 80(8):615-20.
- Khanna KK and Jackson SP (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection.
Nature Genetics 27:247-54.

-
- Knehr S, Zitzelsberger H, Braselmann H, Nahrstedt U and Bauchinger M (1996) Chromosome analysis by fluorescence *in situ* hybridization: further indications for non-DNA-proportional involvement of single chromosomes in radiation-induced structural aberrations.
Int J Radiat Biol 70(4):385-92.
- Kojis TL, Gatti RA and Sparkes RS (1991) The cytogenetics of Ataxia teleangiectasia.
Cancer Genet Cytogenet 56:143-156.
- Kuechler A, Neubauer S, Grabenbauer GG, Claussen U, Liehr T, Sauer R and Wendt TG (2002) Is 24-color FISH detection of *in vitro* radiation-induced chromosomal aberrations suited to determine individual intrinsic radiosensitivity?
Strahlenther Onkol 178:209-15.
- Lee JA, Carvalho CM and Lupski JR (2007) A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders.
Cell 131(7):1235-47.
- LENT/SOMA scales for all anatomic sites (1995).
Int J Radiat Oncol Biol Phys Vol. 31 No. 5:1049-1091.
- Liehr T, Thoma K, Kammler K, Gehring C, Ekici A, Bathke KD, Grehl H and Rautenstrauss B (1995) Direct preparation of uncultured EDTA-treated or heparinized blood for interphase FISH analysis.
Appl Cytogenet 21:185-188.
- Lilla C, Ambrosone CB, Kropp S, Helmbold I, Schmezer P, von Fournier D, Haase W, Sautter-Bihl ML, Wenz F and Chang-Claude J (2007) Predictive factors for late complications following radiotherapy for breast cancer.
Breast Cancer Res Treat 106(1):143-50.
- Lindahl T and Wood RD (1999) Quality control by DNA repair.

Science 268: 1897-1905.

Loeffler JS, Harris JR, Dahlberg WK and Little JB (1990) *In vitro* radiosensitivity of human diploid fibroblasts derived from women with unusually sensitive clinical responses to definitive radiation therapy for breast cancer.
Radiation Research 121: 227-231.

Mackay RI and Hendry JH (1999) The modelled benefits of individualizing radiotherapy patients' dose using cellular radiosensitivity assays with inherent variability.
Radiother Oncol 50:67-75.

Martin M, Genesca A and Latre L (2003) Radiation-induced chromosome breaks in ataxia-teleangiectasia cells remain open.
Int J Radiat Biol 79(3):203-210.

Matsumoto K, Ramsay MJ, Nelson DO and Tucker JD (1998) Persistence of radiation-induced translocations in human peripheral blood lymphocytes determined by chromosome painting.
Radiat Res 149(6):602-13.

Michalowski AS (1981) Effects of radiation on normal tissues: Hypothetical Mechanisms and limitations of the *in situ* assays of clonogenicity.
Radiat Environ Biophys 19:175.

Michalowski AS (1995) The pathogenesis and conservative management of radiation injuries.
Neoplasma 42:289.

Meyn MS (1999) Ataxia teleangiectasia, cancer and the pathobiology of the ATM-gene.
Clin Genet 55:289-304.

-
- Morgan WF (2003) Is there a common mechanism underlying genomic instability of bystander effects and other nontargeted effects after exposure to ionizing radiation?
Oncogene 22(45):7094-7099.
- Morrell D, Chase CL and Swift M (1990) Cancers in 44 families with ataxia-teleangiectasia.
Cancer Genet Cytogenet 50:119-123.
- Nahas SA, Butch AW, Du and Gatti R (2009) Rapid flow cytometry-based structural maintenance of chromosomes 1 (SMC1) phosphorylation assay for identification of ataxia-teleangiectasia homozygotes and heterozygotes.
Clinical Chemistry 55:3.
- Natarajan AT, Vyas RC, Darroudi F and Vermeulen S (1992) Frequencies of X-ray-induced chromosome translocations in human peripheral lymphocytes as detected by *in situ* hybridisation using chromosome-specific DNA libraries.
Int J Radiat Biol 61:199-203.
- Natarajan AT, Boej JJWA, Vermeulen S and Balaje AS (1996) Frequencies of X-ray-induced pericentric inversions and centric rings in human blood lymphocytes detected by FISH using chromosome arm specific DNA libraries.
Mutation Research 372:1-7.
- Neitzel H (1986) A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines.
Human Genet 73:320-26.
- Neubauer S, Gebhart E, Schmitt G, Birkenhake S and Dunst J (1996) Is chromosome *in situ* suppression (CISS) hybridization suited as a predictive test for intrinsic radiosensitivity in cancer patients?
Int J Oncol 8:707-12.

Neubauer S, Dunst J and Gebhart E (1997) The impact of complex chromosomal rearrangements on the detection of radiosensitivity in cancer patients.
Radiother Oncol 43:189-195.

Neubauer S, Arutyunyan R, Stumm M, Dörk T, Bendix R, Bremer M, Varon R, Sauer R and Gebhart E (2002) Radiosensitivity of ataxia teleangiectasia and Nijmegen breakage syndrome Hygotes and Heterocygotes as determined by three-color FISH chromosome painting.
Radiat Res 157:312-21.

Norman A, Iwamoto KS and Kagan AR (1992) Radiation sensitive breast cancer patients.
Radiother Oncol 23:196-97.

Nowak-Wegrzyn A, Crawford TO, Winkelstein JA, Carson KA, Lederman HM (2004) Immunodeficiency and infections in ataxia-teleangiectasia.
J Pediatrics 144:505-11.

Olive PL (1999) DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology.
Int J Radiat Biol 75:395-405.

OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man 208900 Ataxia teleangiectasia
<http://www.3.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/dispim?2089>

Oppitz U, Bernthaler U, Schindler D, Sobeck A, Hoehn H, Platzner M, Rosenthal A and Flentje M (1999) Sequence analysis of the ATM gene in 20 patients with RTOG grade 3 or 4 acute and/or late tissue radiation side effects.
Int J Radiat Oncol Biol Phys 44(5): 981-88.

Oppitz U, Schulte S, Stopper H, Baier K, Müller M, Wulf J, Schakow K and Flentje M (2002) *In vitro* radiosensitivity in lymphocytes and fibroblasts by colony formation and comet assay: comparison with clinical acute reactions to radiotherapy in breast cancer patients.

Int J Radiat Biol 78(7):611-616.

Pavy JJ, Letschert J, Littbrand B, Mornex F, Bernier J, Gonzales-Gonzales D, Horiot JC, Bolla M and Bartelink H (1995) Late effects toxicity scoring: the SOMA scale.

Int J Radiat Oncol Biol Phys Vol. 31 No. 5:1043-1047.

Peacock J, Ashton A, Bliss J, Bush C, Eady J, Jackson C, Owen R, Regan J and Yarnold J (2000) Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy.

Radiother Oncol 55:173-178.

Peters LJ (1996) Radiation therapy tolerance limits. For one or for all?

Cancer 77:2379-85.

Peters LJ, Ang KK and Thames HD (1988) Fractionation in the treatment of head and neck cancer: A critical comparison of different strategies.

Acta Radiol Oncol 27:185.

Plummer SM, Pheasant AE, Johnson R, Faux SP, Chipman JK and Hulten MA (1994) Evaluation of the relative sensitivity of chromosome painting (FISH) as an indicator of radiation induced damage in human lymphocytes.

Hereditas 121(2):139-45.

Renwick A, Thompson D and Seal S (2006) ATM mutations that cause ataxia-teleangiectasia are breast cancer susceptibility alleles.

Nat Genet 38(8):873-75.

Rogers PB, Plowman PN, Harris SJ and Arlett CF (2000) Four radiation hypersensitivity cases and their implications for clinical radiotherapy.

Radiother and Oncol 57:143-154.

-
- Rothkamm K, Kühne M, Jeggo PA and Löbrich M (2001) Radiation-induced genomic rearrangements formed by nonhomologous end-joining of DNA-doublestrand breaks.
Cancer Research 61:3886-3893.
- Rubin P, Constine LS, Fajardo LF, Phillips TL and Wasserman TH (1995) Overview: Late effects of normal tissues (LENT) scoring system.
Int J Radiat Oncol Biol Phys Vol. 31 No. 5:1041-1042.
- Ruiz de Almodovar JM, Guirado D, Nunez MI, Lopez E, Guerrero R, Valenzuela MT, Villalobos N and del Moral R (2002) Individulization of radiotherapy in breast cancer patients: possible usefulness of a DNA damage assay to measure normal cell radiosensitivity.
Radiother Oncol 62:327-33.
- Russell NS, Grummels A and Hart AAM (1998) Low predictive value of intrinsic fibroblast radiosensitivity for fibrosis development following radiotherapy for breast cancer.
Int J Radiat Biol 73:661-670.
- Savage JRK and Simpson PJ (1994) FISH "painting" pattern resulting from complex exchanges.
Mutat Res 312:51-60.
- Savitsky K, Sfez S, Tagle DA, Ziv Y, Sartiel A, Collins FS, Shiloh Y and Rotman G (1995a) The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species.
Hum Mol Genet 4: 2025-2032.
- Schröck E, Du Manoir ES, Veldmann T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y and Ried T (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes.
Science 273: 494-497.

-
- Scott D, Spreadborough AR, Jones LA, Roberts SA and Moore SJ (1996) Chromosomal radiosensitivity in G₂-phase lymphocytes as an indicator of cancer predisposition.
Radiat Res 145:3-16.
- Scott D, Barber JBP, Levine EL, Burrill W and Roberts SA (1998) Radiation-induced micronucleus assay induction in lymphocytes identifies a high frequency of radiosensitive cases among breast cancer patients: a test for predisposition?
Br J Cancer 77:614-620.
- Senger G, Chudoba I and Plesch A (1998) Multicolor-FISH-the identification of chromosome aberrations by 24 colors.
BIOforum 9/98:499-503.
- Shibamoto Y, Streffer C, Fuhrmann C and Budach V (1991) Tumor radiosensitivity Prediction by the cytokinesis-block micronucleus assay.
Radiat Res 128:293-300.
- Shiloh Y, Parshad R, Frydman M, Sanford KK, Portnoi S, Ziv Y and Jones GM (1989) G₂-chromosomal radiosensitivity in families with ataxia-teleangiectasia.
Hum Genet 84:15-18.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells.
Exp Cell Res 75:184-191.
- Smith KC, Hahn GM, Hoppe RT and Earle JD (1980) Radiosensitivity *in vitro* of human fibroblasts derived from patients with a severe skin reaction to radiation therapy.
Int J Radiat Oncol Biol Phys 6:1573-1575.
- Somosy Z (2000) Radiation response of cell organelles.
Micron 31(2): 165-81.

-
- Speicher MR, Ballard SG and Ward DC (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH.
Nature Genetics 12:368-375.
- Spurbeck JL, Zinsmeister AR, Meyer KJ and Jalal SM (1996) Dynamics of chromosome spreading.
Am J Med Genet 61:387-393.
- Stephens JC, Cavanaugh ML, Gradie MI, Mador ML and Kidd K (1990) Mapping the human genome: current status.
Science 250:237-244.
- Stone HB, Coleman CN, Anscher MS and McBride WH (2003) Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms.
Lancet Oncol 4(9):529-36.
- Strasser H, Grabenbauer GG, Sprung CN, Sauer R und Distel LV (2007) DNA double-strand break induction and repair in irradiated lymphoblastoid, fibroblast cell lines and white blood cells from ATM, NBS and radiosensitive patients.
Strahlenther Onkol 183(8):447-53.
- Streffer C (1997) Genetische Prädisposition und Strahlenempfindlichkeit bei normalen Geweben.
Strahlenther Onkol 173:462-8.
- Stumm M, Neubauer S, Kleindorff S, Wegner RD, Wieacker P and Sauer R (2001) High frequency of spontaneous translocations revealed by FISH in cells from patients with the cancer-prone syndromes ataxia teleangiectasia and Nijmegen breakage syndrome.
Cytogenet Cell Genet 92(3-4):186-91.
- Surrallés J and Natarajan AT (1997) Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey.

Mutation Res 392(1-2):165-174.

Swift M, Reitnauer PJ, Morrell D and Chase CL (1987) Breast and other cancers in families with ataxia-teleangiectasia.

New Eng J Med 316:1289-1294.

Swift M, Morrell D, Massey RB and Chase CL (1991) Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-teleangiectasia.

New Eng J Med 325:1831-36.

Taylor AMR, Oxford JM and Metcalfe JA (1981) Spontaneous cytogenetic abnormalities in lymphocytes from thirteen patients with ataxia teleangiectasia.

Int J Cancer 27:311-19.

Tchirkov A, Bay JO, Pernin D, Bignon YJ, Rio P, Grancho M, Kwiatowski F, Giollant M, Malet P and Varelle P (1997) Detection of heterozygous carriers of the ATM-gene by G₂-phase chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes.

Hum Genet 101:312-316.

Thompson LH and Jeggo PA (1995) Nomenclature of human genes involved in ionizing radiation sensitivity.

Mutat Res 337:131-4.

Tucker SL, Turesson I and Thames HD (1992) Evidence for interindividual differences in the radiosensitivity of human skin.

Eur J Cancer A:1783-91.

Turesson I, Nyman J, Holmberg E and Oden A (1996) Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients.

Int J Radiat Oncol Biol Phys 36:1065-1075.

Turesson I, Carlsson J, Brahme A, Glimelius B, Zackrisson B and Stenerl  w B (2003) Biological response to radiation therapy.

Acta Oncologica 42(2):92-106.

Vral A, Thierens H and de Ridder L (1997) *In vitro* micronucleus-centromere assay to detect radiation-damage induced by low doses in human lymphocytes.

Int J Radiat Biol 71:61-68.

Verma RS and Babu A: Human Chromosomes - Principles and Techniques.

McGraw-Hill, Inc. (1994).

Weise A, Heller A, Starke H, Mrasek K, Kuechler A, Pool-Zobel BL, Claussen U and Liehr T (2003) Multitude multicolor chromosome banding (mMCB) - a comprehensive one-step multicolor FISH banding method.

Cytogenet Genome Res 103(1-2):34-9.

Weissberg JB, Huang DD and Swift M (1998) Radiosensitivity of normal tissues in ataxia-teleangiectasia heterozygotes.

Int J Radiat Oncol Biol Phys 42(5):1133-6.

Wiencke JK, Wara DW, Little JB, Kelsey KT (1992) Heterogeneity in the clastogenic response to X-rays in lymphocytes from ataxia-teleangiectasia heterozygotes and controls.

Cancer Causes Control 3:237-45.

Withers HR and Mc Bride WH: Biologic Basis of Radiation Therapy. In: Withers and Mc Bride : Principles and practice of Radiation Oncology. 3rd Edition by C.A. Perez and L.W. Brady, Lippincott-Raven Publishers Philadelphia (1997).

Withers HR, Peters LJ, Taylor JMG (1995) Late normal tissue sequelae from radiation therapy for carcinoma of the tonsil: Patterns of fractionation study of radiobiology.

Int J Radiat Oncol Biol Phys 33:563.

Wood RD, Mitchell M, Sgouros J and Lindahl T (2001) Human DNA repair genes.

Science 291:1284-1289.

Woods CG and Taylor AMR (1992) Ataxia teleangiectasia in the British Isles: the clinical and laboratory features of 70 affected individuals.

Quart J Med 82:169-179.

Zech L and Haglund U (1978) A recurrent structural aberration t(7;14) in phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes.

Hereditas 89:69-73.

8 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AT	Ataxia teleangiectasia = Louis-Bar-Syndrom
ATM-Gen	Ataxia teleangiectasia mutated Gen
BER	Base Excision Repair = Basenexcisionsreparatur
CA	Comet assay
CCD-Kamera	Charge-coupled-device- Kamera = gekühlter, ladungsgekoppelter Bildsensor
CCR	Complex Chromosomal Rearrangements
CSA	Colony survival assay
Cy5	Cyanine5
Cy5.5	Cyanine5.5
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DEAC	Diethylaminocumarin
DNA	desoxy ribonuclein acid
Cot1-DNA	DNA mit einem Cot-Wert von 1,0
DSB	double strand breaks = Doppelstrangbrüche in der DNA, Kontinuitätsunterbrechung des DNA-Doppelstranges
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
FA	Formamid
3-Farb-FISH	Färbetechnik, bei der durch <i>in situ</i> Hybridisierung unter Verwendung von 3 wcp-Sonden und somit 3 verschiedenen Farbkanälen Chromosomen sichtbar gemacht werden

FC-pSMC1 assay	Durchflusszytometrie-basierter Test zum Nachweis der ATM-abhängigen Phosphorylierung des SMC1-Proteins nach DNA-Schädigung
M-FISH	24 multi-color Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung, Färbetechnik, bei der durch Kombination von 6 Farbkanälen alle 24 Chromosomen jeweils eine bestimmte Farbkombination zugeordnet werden kann, multi-colorFISH mit Ganzchromosomenbanken
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
NER	Nucleotide Excision Repair = Nukleotidexcisionreparatur
SpO	Spectrum Orange
SMC1	structural maintenance of chromosomes 1, Protein, dass für die Aufrechterhaltung der Struktur der Chromosomen 1 nach Einwirkung von DNA-schädigenden Agenzien verantwortlich ist
TR	Texas Red
wcp-Sonden	whole chromosome painting-Sonden ein gesamtes Chromosom wird mit einer bestimmten Kombination von Fluoreszenzfarbstoffen markiert

9 Anhang

9.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die durch ihre Hilfsbereitschaft und Geduld zur Anfertigung der vorliegenden Arbeit mit beigetragen haben.

Besonders danken möchte ich:

dem unerwartet früh verstorbenen ehemaligen Institutsdirektor Prof. Dr. med. Uwe Claussen für die herzliche Aufnahme im Institut und die Vergabe des Themas

Dr. med. Alma Küchler möchte ich danken für die gute Betreuung der Arbeit und ihre Diskussionsfreudigkeit beim Lösen fachlicher Probleme

Dr. rer. nat. med. habil. Thomas Liehr für die Übernahme der Arbeit und des Erstgutachtens

dem Team des Labors für molekulare Zytogenetik Dr. rer. nat. Anita Heller, Dr. rer. nat. Anja Weise, Dipl. biol. Kristin Mrasek, Isabell Hartmann, Monika Ziegler sowie allen anderen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Humangenetik danke ich für die freundliche Aufnahme im Institut, die Einarbeitung in die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und die geduldige Beantwortung all meiner Fragen

ausserdem danke ich Alexander Rapp für die Beratung in statistischen Fragen

meiner Familie und meinen Freunden möchte ich für den grenzenlosen Rückhalt und die langjährige Unterstützung danken

9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Arbeit und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. med. Alma Küchler, PD Dr. rer. nat. med. habil. Thomas Liehr, Prof. Dr. med. Uwe Claussen, Dr. rer. nat. Anita Heller, Dr. rer. nat. Anja Weise, Isabelle Hartmann,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde, dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 25.06.09

Annett Johné

9.3 Lebenslauf

Name: Annett Johne
Geburtsdatum: 10.04.1977
Geburtsort: Arnstadt
Familienstand: ledig

S c h u l e

September 1983
bis Juli 1991
Grundschule in Plaue

September 1991
bis Juli 1995
Gymnasium in Arnstadt

Juli 1995
Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

S t u d i u m

Oktober 1995
bis Juli 1996
Studium der Rechtswissenschaften über 2 Fachsemester an
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

September 1996
bis September 1997
Au pair in England, Besuch einer Sprachschule und
Erlangung des Certificate of Advanced English der
University of Cambridge

Oktober 1997
Beginn des Humanmedizinstudiums an der Friedrich-
Schiller-Universität Jena

März 2000
Ablegung der Ärztlichen Vorprüfung (Physikum)

Beurlaubung während des Sommersemesters zur Durchfüh-
rung von Forschungsarbeiten im Labor

August 2001
Ablegung der 1. Ärztlichen Prüfung (1. Staatsexamen)

Oktober 2001
Fortsetzung des Humanmedizinstudiums in Jena

März 2004
Ablegung der 2. Ärztlichen Prüfung (2. Staatsexamen)

April bis August
1. Tertial Praktisches Jahr: Katholisches Krankenhaus Erfurt,

August bis
November 2004
2. Tertial Praktisches Jahr: Spital Zimmerberg, Horgen
(Schweiz), Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe

November 2004 bis März 2005	3. Tertial Praktisches Jahr: Katholisches Krankenhaus Erfurt, Abteilung für Innere Medizin, Gastroenterologie
Mai 2005	Ablegung der 3. Ärztlichen Prüfung (3. Staatsexamen)
Oktober 2005 bis November 2007	Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe in der Ge- meinschaftspraxis Dr. M. Hummel/ Dr. H. Neuhauser, tätig in der Belegabteilung des Krankenhauses Bad Säckingen
Januar 2008 bis Juni 2009	Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe in der Frauenklinik Heilbronn
seit Juli 2009	Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe in der Universitätsfrauenklinik Jena